

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Aislamiento e identificación de hongos a partir de
Anopheles albimanus (diptera: culicidae) procedente de
Trujillo, La Libertad (Perú)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Gabriela Lesli Calle Pacheco

ASESOR

Pedro Luis Castellanos Sanchez

Lima - Perú

2016

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mis padres, Doña Ana María Pacheco Navarro y Hugo Froilán Calle Alva, por darme la vida y por apoyarme siempre para poder superarme y lograr mis objetivos, ya que sin su apoyo tal vez no hubiera podido alcanzar la meta que ahora he cumplido.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mis padres por darme la oportunidad de vivir y hacer de mi alguien en la vida.

Al Dr. Pedro L. Castellanos Sánchez, por ser un gran maestro y orientarme a que cumpla mis metas, por el apoyo desinteresado que me brindo para la realización del presente trabajo de Tesis y principalmente por la amistad y consejos que me ha brindado en todos estos años.

A la Blga. Bertha Moreno Rodríguez, responsable del Laboratorio de Referencia Regional de La Libertad, por darme las facilidades de trabajar en el Laboratorio y su apoyo en los muestreos.

Al Blgo. Abraham G. Cáceres, por su apoyo desinteresado en la ejecución del presente trabajo de investigación.

A los integrantes de mi comité de Tesis, por las observaciones y apoyo en la realización de este manuscrito.

A mis maestros de pre grado, que de una o de otra forma contribuyeron en mi formación y elaboración de este trabajo.

A mis abuelos Juana, Froilán, Teresa y Rubén, por su apoyo y cariño en mis años de estudiante de pre grado.

A mis hermanos Alejandra, Adriana y Víctor Hugo, por su apoyo moral y motivación en todo el tiempo que me emplee para culminar este trabajo.

A Víctor Manuel Narro, por apoyarme durante nuestros años de pregrado, en la realización de mi investigación y brindarme su amistad incondicional.

A mis compañeros de pre grado Karen Flores, Olenka Poma, Renzo Valderrama, Miguel Luna y Bertha Espinoza por brindarme su amistad y apoyarnos mutuamente para culminar nuestros estudios.

A todos aquellos que de alguna forma me han apoyado en la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 HONGOS	3
2.2 HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	5
2.3 IMPORTANCIA DE LOS MOSQUITOS <i>Anopheles albimanus</i>	13
2.4 BIOLOGÍA Y BIONOMÍA DE <i>Anopheles albimanus</i>	16
2.5 MÉTODO DE CONTROL DE MOSQUITOS <i>Anopheles</i>	21
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 MATERIAL	24
4.2 MÉTODOS	25
V. RESULTADOS	29
5.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS	29
5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	30
VI. DISCUSIÓN	37
VII. CONCLUSIONES	41
VIII. RECOMENDACIONES	42
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
X. ANEXOS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Mapa de la ciudad de Trujillo.....	50
Figura 2 Colecta de larvas y adultos de <i>Anopheles albimanus</i>	51
Figura 3 Colecta de adultos de <i>Anopheles albimanus</i>	52
Figura 4 Procesamiento de larva, pupas y adultos de <i>A. albimanus</i> muertos.....	53
Figura 5 Incidencia de los géneros de hongos con posible potencial entomopatógeno aislados de mosquitos <i>Anopheles albimanus</i>	54
Figura 6 Porcentaje de cepas con posible potencial entomopatógeno por estado evolutivo del mosquito <i>Anopheles albimanus</i> : larvas, pupas o adultos.....	54
Figura 7 Cantidad de cepas de hongos aislados con posible potencial entomopatógeno, colectados en las localidades de Laramie y Verdun, La Libertad – Perú. 2012.....	55
Figura 8 Morfología de <i>Fusarium sp.</i> (AL-2m).....	56
Figura 9 Morfología de <i>Fusarium sp.</i> (AL-10).....	57
Figura 10 Morfología de <i>Fusarium sp.</i> (Lv-1).....	58
Figura 11 Morfología de <i>Fusarium sp.</i> (Av-21).....	59
Figura 12 Morfología de <i>Fusarium sp.</i> (Av-28).....	60
Figura 13 Morfología de <i>Acremonium sp.</i> (AL-2a).....	61
Figura 14 Morfología de <i>Acremonium sp.</i> (Av1-b).....	62
Figura 15 Morfología de <i>Acremonium sp.</i> (Av-10).....	63

Figura 16	Morfología de <i>Acremonium sp.</i> (Av-13).....	64
Figura 17	Morfología de <i>Acremonium sp.</i> (Av-23a).....	65
Figura 18	Morfología de <i>Aspergillus niger</i> (AL-12).....	66
Figura 19	Morfología de <i>Aspergillus niger</i> (Av-20b).....	67
Figura 20	Morfología de <i>Aspergillus niger</i> (Pv-1).....	68
Figura 21	Morfología de <i>Alternaria sp.</i> (Av-19).....	69
Figura 22	Morfología de <i>Alternaria alternata</i> (Av-30).....	70

RESUMEN

Los hongos son organismos heterotróficos de gran importancia ecológica, se encuentran en los ambientes más diversos y sobre casi todos los tipos de substratos; son capaces de degradar todo tipo de restos orgánicos, independientemente de su origen. Algunos géneros pueden ser patógenos para insectos (entomopatógenos) y ocasionar su muerte. Los hongos entomopatógenos presentan gran relevancia en el control biológico; existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos. El control biológico de insectos vectores de organismos patógenos que producen enfermedades en humanos viene presentando resultados prometedores. El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar hongos del mosquito *Anopheles albimanus*, con la finalidad de que sean probados y aplicados como potenciales entomopatógenos en otros estudios para el control de Malaria. Las colectas de mosquitos *Anopheles albimanus*, se realizaron en criaderos temporales ubicados en las localidades de Laramie y Verdun del departamento de La Libertad. Las muestras se procesaron en laboratorio de Referencia Regional de Trujillo. Para el aislamiento de hongos se realizó desinfecciones a los cadáveres de mosquitos (larvas, pupas y adultos) con Hipoclorito de sodio al 5% durante 1 minuto; posteriormente los especímenes se mantuvieron en cámaras húmedas a temperatura ambiente hasta visualizar crecimiento de micelio; la siembra de micelio se realizó en Agar Extracto de Malta, los hongos se identificaron aplicando la técnica de microcultivo, utilizando las características morfológicas microscópicas y macroscópicas. Se aislaron un total de 32 cepas de hongos. El 75% (24) de cepas se obtuvo a partir de adultos, 22% (7) de larvas y 3% (1) de pupas. Los géneros identificados fueron: *Nigrospora* (25%), *Cladosporium* (19%), *Acremonium* (15%), *Fusarium* (15%), *Aspergillus* (9%), *Bipolaris* (9%) y *Alternaria* (6%).

Palabras clave: Hongos, Entomopatógenos, *Anopheles albimanus*, Aislamiento, Malaria.

ABSTRACT

Fungi are heterotrophic organisms of great ecological importance, found in the most diverse environments and on almost all types of substrates; are able to degrade all types of organic remains, regardless of their origin. Some genera can be pathogens for insects (entomopathogens) and cause their death. The entomopathogenic fungi present great relevance in the biological control; there are approximately 700 species of entomopathogenic fungi. Biological control of insect vectors of disease-causing pathogens in humans has shown promising results. The objective of the present study was to isolate and identify fungi of the *Anopheles albimanus* mosquito, in order to be tested and applied as potential entomopathogens in other studies for the control of Malaria. The collections of *Anopheles albimanus* mosquitoes were carried out in temporary farms located in the towns of Laramie and Verdun in the department of La Libertad. The samples were processed in a Regional Reference laboratory in Trujillo. For the isolation of fungi disinfections were carried out on the cadavers of mosquitoes (larvae, pupae and adults) with 5% sodium hypochlorite for 1 minute; The specimens were then kept in moist chambers at room temperature until visualization of mycelial growth; Mycelial seeding was performed in Agar Extract from Malta, the fungi were identified using the microculture technique, using the microscopic and macroscopic morphological characteristics. A total of 32 fungal strains were isolated. 75% (24) of strains were obtained from adults, 22% (7) of larvae and 3% (1) of pupae. The genera identified were: *Nigrospora* (25%), *Cladosporium* (19%), *Acremonium* (15%), *Fusarium* (15%), *Aspergillus* (9%), *Bipolaris* (9%) and *Alternaria* (6%).

Keywords: Fungi, Entomopathogens, *Anopheles albimanus*, isolation, Malaria.

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los hongos son organismos pluricelulares y heterótrofos, pueden ser filamentosos o levaduriformes. Se encuentran distribuidos en todos los ambientes del planeta y pueden ser saprófitos, descomponedores o parásitos. Los hongos tienen gran importancia ecológica, son capaces de degradar todo tipo de restos orgánicos, independientemente de su origen, los transforman en elementos asimilables por las plantas y económicamente tienen implicancia en varias áreas: Medicina humana, Farmacia, Nutrición, fitopatología, agricultura y biotecnología (Pereira *et al.*, 2009).

Algunos hongos pueden ser patógenos debido a la producción de toxinas, mientras que otros son benéficos y juegan un rol ecológico importante degradando materia orgánica (Pereira *et al.*, 2009). Los hongos entomopatógenos son capaces de ocasionar infecciones letales en insectos, por lo que constituyen uno de los grupos de mayor aplicación en el control biológico de insectos (Scholte *et al.*, 2004).

Existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos, y alrededor de 100 géneros son capaces de ocasionar infecciones fúngicas en todos los órdenes de insectos; siendo los géneros más estudiados son: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophora*, *Lagedinium*, *Coelonomycetes* y *Culicinomyces* (Pereira *et al.*, 2009), sin embargo *Fusarium oxysporum*, presenta gran potencial como agente controlador de mosquitos (Scholte *et al.*, 2004; Prakash *et al.*, 2010).

En estudios recientes se viene aplicando hongos entomopatógenos para el control de mosquitos que transmiten patógenos que causan enfermedades en seres humanos, obteniendo buenos resultados (Blanford *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2005). Otros estudios, muestran la capacidad de algunas especies de hongos para eliminar

poblaciones de mosquitos en etapa larval, bajo condiciones de laboratorio y bioensayos in situ, considerando que la tasa de mortalidad depende de factores como: la especie de hongos, el estadio larval, la densidad larvaria y la cantidad de nutrientes disponibles para las larvas (Scholte *et al.*, 2004).

Anopheles albimanus es un díptero de la familia Culicidae, subfamilia Anophelinae, del subgénero Nyssorhynchus, sección Albimanus (Faran, 1980). Es el vector principal de Malaria en la costa norte del país, se distribuye en áreas por debajo de los 450 msnm, abarcando los departamentos de Tumbes, Piura, áreas de Lambayeque, La libertad y Ancash (Calderón *et al.*, 1995), siendo Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad los que presentan mayor riesgo de transmisión de Malaria (Cruz *et al.*, 2004).

El método más aplicado para el control de vectores de Malaria es el químico, aplicando insecticidas en el interior de las viviendas y proveyendo a las personas redes mosquiteras rociadas con insecticida. Alrededor de 70 países del mundo han reportado resistencia del mosquito a los insecticidas piretroides (Vargas *et al.*, 2006; Farenhost y Knols, 2007; WHO, 2012), adicionalmente se sabe que el uso indiscriminado de insecticidas ocasiona alta toxicidad en los seres humanos y animales (Blanco *et al.*, 2000), esto representa un serio problema para el control de Malaria.

Es de crucial importancia realizar investigaciones que permitan encontrar nuevas alternativas de control vectorial de Malaria, que además de ser eficaces, no dañen los ecosistemas en los que interactúan estos mosquitos y puedan complementar o reemplazar los métodos de control existentes. Una buena opción es el uso de hongos entomopatógenos; lo anterior refleja la importancia del presente trabajo donde se aisló e identificó hongos con posible potencial entomopatógenos a partir de mosquitos *Anopheles albimanus*, como alternativa para el control de la Malaria.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 HONGOS

Los hongos presentan una serie de características que los convierte en microorganismos indispensables en los ecosistemas. Estos microorganismos pueden ser encontrados en los ambientes más diversos y prácticamente sobre todos los substratos, siempre que exista disponibilidad de nutrientes como también condiciones favorables para su sobrevivencia (Putzke *et al.*, 1998).

Los hongos tienen gran importancia ecológica ya que son capaces de degradar todo tipo de restos orgánicos, independientemente de su origen y los transforman en elementos asimilables por las plantas; económicamente tienen implicancia en áreas como: medicina humana, farmacia, nutrición, fitopatología, agricultura y biotecnología; algunos pueden ser patógenos para otros seres vivos debido a la producción de toxinas y otros pueden atacar ocasionalmente a insectos o desarrollar relaciones simbióticas (Pereira *et al.*, 2009). Por ello se viene estudiando la capacidad de los hongos como agentes de control biológico de mosquitos vectores de organismos que ocasionan enfermedades tropicales.

2.1.1 Citología

Los hongos son organismos eucariotas, unicelulares (levaduriformes) o pluricelulares (filamentosos), presentan una pared celular que contiene quitina, glicoproteínas y beta-glucanos. No presentan pigmentos fotosintéticos, por lo que son heterótrofos y necesitan de un aporte de carbono y nitrógeno fijado orgánicamente; presentan dos tipos de reproducción sexual (a través de esporas sexuales) y asexual (mediante esporangiosporas o conidios) (Molinario *et al.*, 2009). Adicional a la reproducción, las esporas, les sirven para poder dispersarse a otros lugares y algunas les ayudan a

sobrevivir bajo condiciones adversas, como la deshidratación o la congelación (Putzke *et al.*, 1998).

En los hongos pluricelulares, las células se encuentran dispuestas en largos filamentos denominados hifas, el conjunto de hifas recibe por nombre micelio (sistema vegetativo), responsable de la absorción de nutrientes requeridos para el crecimiento y la reproducción. La organización y tamaño del micelio depende del sustrato y de la fuente de nutrientes; se desarrolla tanto en la superficie de la materia orgánica en descomposición como en el interior de los tejidos que parasita (Putzke *et al.*, 1998). Las hifas pueden o no encontrarse separadas por paredes llamadas septos, recibiendo el nombre de tabicadas o cenocíticas respectivamente y pueden contener de uno a más núcleos, al igual que mitocondrias y otras organelas (Barnett y Hunter, 1998). La diferenciación de las hifas vegetativas se realiza generalmente sobre el plano del medio, de forma vertical, formando esporangióforos o conidióforos, dentro de los cuales se originan las esporangiosporas o conidios (Putzke *et al.*, 1998).

2.1.2 Ciclo Biológico

El ciclo de vida de los hongos comprende dos fases. Una fase somática, en la que se desarrolla el micelio vegetativo para nutrirse; y otra reproductiva, que puede ser de forma sexual o asexual. De acuerdo al tipo de reproducción que realizan, los hongos se dividen en los siguientes grupos: holomorfos (realiza ambos tipos de reproducción), anamorfos (realiza solo la reproducción asexual) y telemorfos (realiza solo la reproducción sexual) (Molinario *et al.*, 2009).

2.1.3 Nutrición y Metabolismo

Los hongos son organismos heterótrofos, saprófitos o parásitos y necesitan de materia orgánica formada como fuente de energía y constituyentes celulares. Utilizan enzimas para degradar la materia orgánica, descomponiendo los complejos compuestos

orgánicos en moléculas simples que estos absorben a través de sus paredes celulares. Debido a que necesitan de sustancias ya elaboradas, estos se ven obligados a vivir en relaciones de saprofitismo, parasitismo, simbiosis o mutualismo (Molinario *et al.*, 2009).

Dentro de los requerimientos nutricionales de los hongos, el carbón es el nutriente que necesitan en mayor proporción, sin embargo también requieren una fuente de nitrógeno. La mayoría de Deuteromicetos poseen enzimas que les permiten utilizar el carbono de diferentes fuentes; siendo, la celulosa la fuente más frecuente (Barnett y Hunter, 1998). En la naturaleza, la materia orgánica les proporciona el nitrógeno necesario para su crecimiento; sin embargo, la mayoría de los hongos también puede utilizar fuentes inorgánicas de nitrógeno. La mayoría de los hongos imperfectos utilizan amonio y aminoácidos como fuentes de nitrógeno (Barnett y Hunter, 1998; Molinario *et al.*, 2009). En cuanto a micronutrientes, los hongos necesitan elementos como P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe y Zn para su crecimiento, estos son proporcionados por todos los compuestos orgánicos naturales. Los hongos crecen de manera óptima cuando el sustrato es ligeramente ácido entre pH 5,0 y 6,0. Sin embargo, generalmente estos pueden lograr un buen crecimiento en un rango mucho más amplio de pH, entre 3,0 a 8,0. Ciertas especies son capaces de tolerar incluso mayores rangos, por ejemplo *Aspergillus niger* tolera sustratos con rangos de pH 2.8 a 8.8 y *Fusarium oxysporum* soporta rangos de pH entre 1.8 a 11.1 (Barnett y Hunter, 1998).

2.2 HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos son los organismos de mayor importancia en el control microbiano de insectos plaga, existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos y alrededor de 100 géneros capaces de ocasionar infecciones letales en todos los órdenes de insectos (Scholte *et al.*, 2004). En estudios recientes

se han implementado hongos entomopatógenos para el control de adultos de mosquitos obteniendo buenos resultados (Blanford *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2005, 2006).

Entre los géneros de hongos controladores de mosquitos más importantes se encuentran: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Leptolegnia*, *Coelomomyces* y *Culicinomyces*, pertenecientes a la clase Zygomycetes e Hyphomycetes (García *et al.*, 2008; Scholte *et al.*, 2004).

Las ventajas del uso de hongos entomopatógenos sobre otros microorganismos controladores es que estos no requieren ser ingeridos para infectar al insecto, las esporas del hongo llamadas conidias, atacan al insecto a través del tegumento externo de forma pasiva (Farenhost y Knols, 2007), la gran mayoría posee un amplio rango de hospederos, no contaminan el medio ambiente, no son tóxicos para los humanos, no desarrollan resistencia y no dejan residuos en los alimentos (García *et al.*, 2008; Scholte *et al.*, 2004).

2.2.1 Modo de acción de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos infectan al hospedante a través de la cutícula externa; por lo que, el contacto entre el hongo y el insecto es fundamental para el inicio del proceso infeccioso. En forma general el proceso de patogénesis (micosis), involucra tres fases: adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, penetración del hemocele del insecto por medio del tubo germinativo y el desarrollo del hongo dentro del cuerpo del insecto y su multiplicación que generalmente resulta en la muerte del insecto (Téllez *et al.*, 2009). En todos los casos la unidad infectiva es la espora (García *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero y germinación de la espora

Constituye una de las fases más importantes del proceso infeccioso y está relacionada con la especificidad hospedante - patógeno. Sólo las cepas más virulentas logran exitosamente la adhesión. El proceso se inicia cuando la espora se adhiere a la cutícula del insecto, mediante el reconocimiento de receptores específicos (Monzón, 2001). El proceso de adhesión esta mediado por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo del tipo adhesinas, estas se localizan en la superficie de las esporas. Estas sustancias aparecen al inicio del contacto del hongo con el insecto. Se ha demostrado también que los iones divalentes de Ca^{2+} y el Mg^{2+} promueven la adhesión de las esporas a la cutícula de los insectos pues reducen las fuerzas de repulsión electrostáticas. En el cuerpo del insecto existen ciertas zonas preferidas para la adhesión, como son las regiones intersegmentales, en donde la composición y estructura son diferentes al resto del cuerpo del insecto (Téllez *et al.*, 2009).

Luego de la adhesión sobre el integumento del insecto, ésta germina emitiendo un tubo germinativo, formando luego un apresorio (hifa de penetración). El tubo germinativo puede ser largo o corto y en algunos casos puede no formarse (Téllez *et al.*, 2009). En el proceso de germinación juegan un rol importante los requerimientos nutricionales de la espora y las condiciones ambientales presentes. En este sentido se ha observado que las esporas de *Beauveria* son más exigentes en carbono y energía que las de *Metarhizium* (Monzón, 2001).

2.2.1.2 Penetración en el hemocele

La forma en la que los hongos entomopatógenos penetran en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Téllez *et al.*, 2009). La penetración ocurre después de la germinación, gracias a la acción combinada de mecanismos físicos y químicos, tanto en el insecto como en el hongo (Monzón, 2001). La primera etapa

consiste en la presión que ejerce el haustorio (estructura fúngica), por la cual se deforma la capa cuticular rompiendo las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción hidrolítica de proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando el ingreso del hongo (Monzón, 2001). Se ha determinado que la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa y que estas acciones pueden ser coadyuvadas por la secreción de ácidos orgánicos (Téllez *et al.*, 2009).

Los hongos pueden utilizar otro mecanismo para penetrar el hemocoele de los insectos, ingresando a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas; la humedad de la cavidad bucal permite que las esporas germinen rápidamente (Téllez *et al.*, 2009).

2.2.1.3 Desarrollo en el hemocoele

Después de la penetración, el hongo llega al hemocoele y evade el sistema inmune del insecto; seguidamente se produce un ensanchamiento y ramificación de la hifa dentro del tejido del insecto. La multiplicación se realiza principalmente por gemación y en la mayoría de los hongos se produce una transición dimórfica de micelio a levadura, produciendo formas unicelulares, denominadas blastosporas en los Deuteromicetos (Monzón, 2001; Téllez *et al.*, 2009).

La micosis ocasiona en el insecto síntomas fisiológicos anormales como convulsiones, falta de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. Para enfrentar los mecanismos de defensa de los insectos, los hongos han desarrollado estrategias defensivas, como la producción de toxinas (Téllez *et al.*, 2009). Las toxinas producidas son macromoléculas proteicas y sustancias de bajo peso molecular, estas son secretadas en cantidades significativas tanto en el sustrato como en el cuerpo del insecto. Las más comunes son de tipo destruxinas, dimetildextruxinas y protodextruxinas; el hongo *Metarhizium* sintetiza las enzimas serilproteasa y

sulfidrilproteasa (Monzón, 2001). Los metabolitos sintetizados por los hongos en muchos casos son la causa directa de la muerte del insecto, ya que actúan sobre las células receptoras del sistema inmune del insecto (Téllez *et al.*, 2009).

Cuando el insecto muere, las hifas emergen del cadáver y bajo condiciones de alta humedad, el hongo esporula sobre el hospedero y las esporas se dispersan mediante el viento o el agua, esto depende de las características de la espora y el esporangio (Goettel y English, 1997).

2.2.2 Uso de hongos entomopatógenos en el control de larvas de mosquitos transmisores de Malaria

Las larvas de mosquitos culícidos son filtradoras de partículas orgánicas en suspensión y de microorganismos que se encuentran en el mismo hábitat: bacterias, virus, protozoarios y hongos (Pereira *et al.*, 2009). Existen diversos estudios en los que se muestran las interacciones entre hongos y larvas de mosquitos. Los hongos comúnmente aislados y aplicados en larvas de *Anopheles* son: *Leptolegnia chapmanii*, *Phythium sp.*, *Lagenidium giganteum*, *Entomophthora culicis*, *Beauveria tenella*, *Culicinomyces clavisporus*, *Metarhizium anisopliae*, *Coelomomyces indicus*, y *Geotrichum sp.* (Scholte *et al.*, 2004). Pereira *et al.* en 2009, por primera vez reportaron a los hongos Hyphomycetes: *Acremonium kiliense*, *Aspergillus sydowii*, *Fusarium sacchari* var. *sacchari*, *Fusarium merismoides* var. *merismoides*, *Gliocladium viride*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Penicillium melinii* y *Penicillium oxalicum*, asociados a larvas de mosquitos culícidos en hábitats de la amazonia brasileña.

La actividad larvicida de *Aspergillus parasiticus* aislados de larvas moribundas de *Anopheles gambiae* fue demostrada realizando bioensayos aplicando soluciones de 2×10^5 conidias/ml en bandejas experimentales conteniendo 200 larvas; obteniendo 100

% de mortalidad y se llegó a determinar que el primer estadio larvario fue el más susceptible. Se demostró que las infecciones redujeron marcadamente la longevidad y la fecundidad en *A. gambiae*, *Culex facigans* and *Aedes aegypti* sin importar la fase de desarrollo en la que ocurrió la infección. (Nnakumusana, 1985). En 1982 se reportó que el hongo *Leptolegnia chapmanii* era capaz de causar 100% de mortalidad en larvas del primer estadio de *Anopheles quadrimaculatus* y *Anopheles albimanus* después de 24 horas de exposición (Scholte *et al.*, 2004).

En conclusión el uso de hongos entomopatógenos para el control de mosquitos *Anopheles* es de alta potencialidad, ya que la muerte de los mosquitos se debe mayormente a la producción de múltiples toxinas, que no generan resistencia por parte de los mosquitos como si ocurre con los insecticidas comúnmente aplicados. Sin embargo se debe considerar que las tasas de mortalidad dependen de factores tales como: la especie de hongo, la etapa larval, la densidad larvaria, y la cantidad de nutrientes disponible para las larvas (Prakash *et al.*, 2010).

En la actualidad también se vienen realizando estudios para determinar los efectos larvicidas de algunos metabolitos secundarios producidos por hongos. El uso de estos compuestos, proporciona un enfoque eficaz pues es un método amigable con el medio ambiente. Prakash *et al.*, en 2010 mediante ensayos de laboratorio, reportaron el efecto larvicida de metabolitos extracelulares de *Fusarium oxysporum* en larvas de *Anopheles stephensi*. El bioensayo se realizó aplicando 5 concentraciones diferentes de esporas (1.30, 1.60, 1.77, 1.90 y 2.00 ppm) y se observó mortalidad en todos los estadios larvarios 24, 48 y 72 horas después de la exposición; siendo las larvas del primer y cuarto estadio más susceptibles que las de segundo y tercer estadio.

Lagenidium giganteum es un hongo acuático que se ha utilizado como un agente eficaz para el control de mosquitos, su uso es limitado pues durante el

almacenamiento presenta una baja sobrevivencia y los medios se contaminan. Sin embargo se sabe que este produce metabolitos con efecto toxico, los cuales son fáciles de producir y tienen una larga duración. En un estudio realizado contra larvas de *Anopheles stephensi* se utilizó 5 concentraciones diferentes de metabolitos: 1.68, 1.99, 2.17, 2.30 y 2.40 ppm. El ensayo se realizó enfrentado 20 larvas y 10 ml de solución. Se obtuvo para el primer estadio larvario 100% de mortalidad, aplicando la concentración de 2.17 ppm. La efectividad en el segundo estadio se obtuvo después de 72 horas (Vyas *et al.*, 2007).

2.2.3 Uso de hongos entomopatógenos en el control de mosquitos adultos

Metarhizium anisopliae y *Beauveria bassiana* son los hongos entomopatógenos que ya han demostrado ser útiles en el control insectos plaga. Estos Hyphomycetes pueden infectar y matar insectos sin necesidad de ser ingeridos (Farenhost y Knols, 2007). Los estudios han mostrado que las conidias de *M. anisopliae* y *B. bassiana* son patógenas contra adultos de mosquitos *Anopheles*, ya que se evaluó su acción contra mosquitos *Anopheles stephensi* en laboratorio, obteniendo 80% de mortalidad dentro de 14 días de infección (Blanford *et al.*, 2005).

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* es el agente de biocontrol más utilizado contra mosquitos adultos vectores de Malaria en África. Además de ocasionar rangos significativos de mortalidad, también puede causar reducción en la capacidad de alimentación y la fecundidad (Scholte *et al.*, 2006). *Beauveria bassiana* ha mostrado tener un efecto directo sobre el desarrollo de parásitos *Plasmodium* en el mosquito (Blanford *et al.*, 2005). Se encontró una reducción significativa de la positividad de esporozoitos en los mosquitos debido a la infección fúngica. Sólo 8% de los mosquitos infectados con parásitos y hongos contenían parásitos transmisibles 14 días después de la exposición, en comparación al 35% infectado solo con *Plasmodium* (Blanford *et al.*, 2005).

Un estudio realizado utilizando conidios de *M. anisopliae* en formulaciones aceitosas contra hembras adultas de *Anopheles gambiae*, mostro que las hembras fueron alimentadas una única vez, luego de 48, 72, y 96 horas después de la inoculación mostraron una tendencia reducida a la alimentación. También se encontró que los mosquitos, inoculados con una dosis moderadamente alta de conidios, exhibieron un apetito reducido relacionado con un aumento de crecimiento del hongo. Por otra parte, las hembras infectadas produjeron menor cantidad de huevos por ciclo gonotrófico. Los modelos epidemiológicos muestran que tanto la alimentación y la fecundidad de los mosquitos, son los factores más importantes en la transmisión de la malaria, esto sugiere que este hongo puede tener potencial como agente de control biológico para el control de enfermedades transmitidas por vectores (Scholte *et al.*, 2006).

Otro experimento de campo en Tanzania demostró que telas impregnadas con una base aceitosa de conidias de *M. anisopliae*, infectaron al 23% de las hembras de mosquitos *Anopheles gambiae* que descansaban sobre estas, y redujeron la duración de vida media del mosquito de 4 a 6 días, en comparación con los controles (Scholte *et al.*, 2005). Como los mosquitos no pueden transmitir esporozoitos hasta aproximadamente dos semanas después de una alimentación de sangre, no es necesaria una muerte inmediata del mosquito para reducir la transmisión de la malaria (Blanford *et al.*, 2005).

El hongo *Fusarium oxysporum* es el agente de control de mosquitos de la siguiente generación. *F. oxysporum* básicamente contiene una única toxina y puede ser un buen agente de control en países tropicales. Se ha reportado la eficacia de los metabolitos de *F. oxysporum* contra las larvas de *Anopheles stephensi* y *Culex quinquefasciatus* en el laboratorio. Los bioensayos en laboratorio se realizaron con cinco concentraciones diferentes (1,30, 1,60, 1,77, 1,90, y 2,00 ppm). La mortalidad se observó después de 24, 48 y 72 h contra todos los estadios. Los resultados obtenidos

mostraron significativamente que la exposición al metabolito tiene más patogenicidad 48 horas después de la aplicación (Prakash *et al.*, 2010)

Por estas razones la importancia de profundizar el estudio del impacto de infección fúngica, en el ciclo de vida y la reproducción de los mosquitos vectores, para determinar de esta forma la potencialidad de su uso no sólo para matar a un segmento poblacional, sino también para evaluar el efecto en las cadenas de transmisión.

2.3 IMPORTANCIA DE LOS MOSQUITOS *ANOPHELES ALBIMANUS*

La Malaria es una enfermedad causada por protozoarios parásitos pertenecientes al género *Plasmodium*, que invaden inicialmente el hígado y luego los eritrocitos. Cuatro especies causan las infecciones humanas: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, y *P. ovale*, de las cuales *P. falciparum* es el responsable de la sintomatología clínica más grave y que tiene muchas veces desenlaces fatales (Campuzano y Blair, 2010).

La transmisión natural de la enfermedad se produce a través de la picadura de la hembra anophelina infectada; sin embargo existen otros mecanismos como: transfusiones sanguíneas, uso de jeringas infectadas, la vía transplacentaria y los trasplantes de órganos (Purizaca, 2008). En el Perú hasta el momento han sido descritos como vectores principales de Malaria las siguientes especies: *Anopheles darlingi*, *A. pseudopunctipennis*, *A. albimanus* y *A. benarrochi*, y como vectores secundarios a *Anopheles calderoni*, *A. nuneztovari*, *A. rangeli*, *A. oswaldoi*, *A. trinkae* y *A. evansae*, y como accidentales *A. mattogrossensis* y *A. fluminensis* (Calderón *et al.*, 1995).

En el Perú el mayor número de casos se presenta en los departamentos de Loreto, Piura, Tumbes, San Martín, Junín y Madre de Dios (INS, 2003). En la costa norte, la transmisión se ve influenciada por factores como la temperatura y la humedad, periodos de lluvia que aumentan los criaderos de los anofelinos y el factor de los cultivos de arroz que se convierten en criaderos permanentes relacionándose directamente al incremento de la población de mosquitos durante las campañas grandes de cultivo de arroz (DGE, 2011).

Anopheles albimanus es un díptero de la familia Culicidae, subfamilia Anophelinae, del subgénero Nyssorhynchus, sección Albimanus. Fue descrito originalmente por Wiedemann en 1820 a partir de especímenes colectado en República Dominicana (Faran, 1980).

Domínguez en 2003, menciona que basados en su morfología, los anofelinos se consideran los mosquitos más primitivos. Existen un estimado de 421 especies de *Anopheles* y la evidencia apunta a que el género se originó en alguno de los continentes derivados de la fragmentación del supercontinente Gondwana (África, India, América del Sur, Australia y Antártida).

Tiene una amplia distribución geográfica, se extiende desde el Sur de los Estados Unidos hasta el Norte de Perú, incluyendo algunas islas del caribe, por lo que se le considera vector primario de malaria en América Central, del Sur e islas del Caribe (Gonzáles, 2005; Faran, 1980; Bejarano, 2003). En el Perú a mediados de los años 60 solo se reportaba la presencia de *A. albimanus* en los valles nor-occidentales de la costa del Perú, como Tumbes, Piura, Chira y el valle del río Jequetepeque (La Libertad) y se le consideraba como el vector más relevante en estas áreas. Basados en evidencias científicas se determinó que este mosquito se distribuye en áreas por debajo de los 450 msnm, correspondientes a los departamentos de Tumbes, Piura,

áreas de Lambayeque, La libertad y Ancash, siendo su límite máximo los 1080 msnm en Piura donde se constituye como el vector más importante de Malaria (Calderón *et al.*, 1995).

En la costa norte de nuestro país, el mosquito se reproduce principalmente en las pozas de arroz con inundación permanente, sin embargo debido a que en los últimos años se ha estado promoviendo fuertemente el cultivo de arroz en la Amazonía, especialmente en San Martín, este vector ha ampliado su área de distribución desde las zonas de costa norte (regiones arroceras por excelencia) hacia el interior del país (MINSA, 2011).

Las hembras de *A. albimanus* presentan gran capacidad adaptativa, lo que les permite seleccionar casi cualquier cuerpo de agua como sitio de ovoposición. El número máximo de huevos depositados es de 100 a 400. Los estadios inmaduros se encuentran preferentemente en hábitats expuestos a la luz del sol donde emerge vegetación de pastizales (pasto fino) o macrofitas acuáticas; de aguas claras a moderadamente turbias, puede ser salobre o fresca, relativamente limpia o con moderada polución y de movimiento moderado; tales como márgenes de estanques, lagos, canales, filtraciones y áreas de drenaje, zanjas, prados o pastizales inundados, embalses, pantanos. Los hábitats que presentan algas verdes filamentosas y sin mucha cantidad de materia orgánica favorecen la productividad (Faran, 1980; Arredondo, 1990).

La eficacia de *Anopheles albimanus* como vector de la Malaria se debe a que pica tanto al hombre como a los animales domésticos y sus tasas de picaduras son bastante altas, alimentándose más de una vez, completando así un ciclo gonotrófico (Arredondo, 1990; Calderón *et al.*, 1995). El máximo de actividad de picada ocurre en

el horario de 20:00 a 23:00 tanto en el intra como en el peri domicilio (endofilia-exofilia) (Calderón *et al.*, 1995).

2.3.1 TRANSMISION DE MALARIA

El inicio de la transmisión se produce cuando un mosquito *Anopheles* hembra pica a un huésped infectado (ser humano) que contiene los parásitos del *Plasmodium* sexualmente diferenciados (microgametocitos y macrogametocitos), los mismos que ingresan al tubo digestivo del mosquito. Los microgametocitos dan origen a otras formas (microgametos), que buscan células femeninas (macrogametos) para fecundarlos. El cigote se transforma en una célula móvil llamada ooquinet. Dentro de las paredes del estómago se da origen a la forma infectante denominada esporozoito; estos transitan por todo el cuerpo del mosquito, llegando hasta las glándulas salivales, permaneciendo aquí hasta ser inoculados en una nueva picadura. Es por vía sanguínea que los esporozoitos ingresan al huésped, en donde permanecen alrededor de 30 minutos hasta penetrar las células hepáticas. Esta fase, también es denominada fase sexual o esporogónica, dura de 14 a 20 días, dependiendo de los factores ambientales (INS, 2003; Purizaca, 2008).

2.4 BIOLOGÍA Y BIONOMÍA DE *Anopheles albimanus*

Estos mosquitos presentan dos etapas bien diferenciadas durante su ciclo de vida: una fase acuática (huevos, larvas y pupas) y otra aérea (adulto). Durante la fase acuática (estadios inmaduros), existen tres formas evolutivas diferentes: huevo, 4 estadios larvarios y pupa. La fase aérea corresponde al mosquito adulto que tiene la capacidad de volar. Usualmente todo el desarrollo, desde huevo a adulto, dura alrededor de unos 8 a 14 días o más, dependiendo de las condiciones de temperatura y disponibilidad de alimento (DIGESA, 2002).

2.4.1 Huevos

La hembra de Anopheles después de cada alimentación con sangre, pone huevos sobre la superficie del agua, generalmente prefieren cuerpos de agua con vegetación emergente (arrozales, pozas, cursos lentos de riachuelos o drenes, etc.) sean permanentes o temporales, inclusive los huecos de los árboles, brácteas u hojas de bromeliáceas (DIGESA, 2002; Rodríguez *et al.*, 2008). Los huevos se mantienen a flote por medio de cámaras de aire llamadas flotadores. El tamaño, forma y patrón de dichos flotadores varían entre las especies y algunas veces entre individuos de la misma especie. Los huevos de *A. albimanus* son alargados y presentan pequeñas manchas de color plateado, que se extienden a lo largo de los flotadores hasta los extremos del huevo (Foratini, 1962; Domínguez, 2003). El número de huevos depositados por postura varía entre 100 a 150 huevos. Los huevos de la mayoría de anofelinos hacen eclosión en 2 a 3 días a temperaturas de 25 a 30 °C, pero esto depende de las condiciones del criadero (Domínguez, 2003).

2.4.2 Larvas

Las larvas de los anophelinos pasan por cuatro fases de muda denominadas estadios. Las formas que adquieren cada una de estas fases se denominan “instar” y son morfológicamente similares excepto por el incremento gradual de tamaño. Morfológicamente, las larvas de los anofelinos se distinguen fácilmente por la ausencia del sifón respiratorio posterior que se encuentra en los culícidos. El periodo de desarrollo de la larva generalmente es de 7 a 10 días, pero puede verse limitado por temperatura, disponibilidad de alimento, interacción con patógenos y depredadores y las características de la vegetación litoral (Domínguez, 2003). Las larvas son filtradoras de superficie y se alimentan de fitoplancton y zooplancton; las bacterias presentes en el medio acuático juegan un rol importante pues favorecen la proliferación de zooflagelados y ciliados (Pereira *et al.*, 2009; Gonzales, 2005). Se les encuentra en hábitats expuestos a la luz del sol, con vegetación (pasto fino) o

macrofitas acuáticas; de aguas claras a moderadamente turbia, relativamente limpia y de movimiento moderado como estanques, lagos, canales, filtraciones, áreas de drenaje y pastizales inundados; en los que tienen contacto con muchos factores bióticos y abióticos como depredadores (peces e insectos), temperatura, exposición a la luz, movimiento del agua y gases disueltos (Faran, 1980; Arredondo, 1990).

2.4.3 Pupa

Las pupas son las fases de transición entre las larvas y el adulto, no se alimentan y son generalmente inactivas, pero si algo les molesta pueden nadar vigorosamente. Normalmente se encuentran flotando en la superficie cuando están en reposo y respiran por medio de un par de estructuras llamadas trompetillas, que se proyectan hacia arriba desde el tórax. Presentan una espina rígida en el margen lateral posterior en el dorso de los segmentos abdominales III al VII. La duración de esta fase es por lo general, de 2 a 3 días. Existe diferencia entre las pupas, las del sexo masculino son más pequeñas y los machos adultos generalmente emergen unas horas antes que las hembras (Domínguez, 2003).

2.4.4 Adulto

Los anofelinos adultos presentan un escutelo curvo en toda su extensión. En los mosquitos adultos, los machos pueden diferenciarse de las hembras por tener pelos más largos en las antenas (plumosas). Las hembras de los anofelinos presentan palpos maxilares, que son casi tan largos como la probóscide. Los anofelinos de ambos sexos reposan o se alimentan, adoptando una posición formando un ángulo de 30° o más con la superficie (Domínguez, 2003).

Los adultos emergen de las pupas en relación 1:1. Al momento de emerger los adultos no pueden volar y deben reposar en el sitio de emergencia durante varias horas para permitir la esclerotización de su tegumento, el secado de alas y rotación de genitales

en el caso de los machos. Antes de la copula las hembras deben ingerir sangre para permitir el desarrollo de los ovarios y la maduración de los huevos no fecundados (oocitos) que esperan la fecundación, generalmente se alimentan de noche. Los machos se alimentan de sustancias azucaradas como néctar y exudados de frutos, a partir de las cuales obtienen la energía que necesitan para volar hasta encontrarse con las hembras y aparearse (Foratini, 1962). La cópula dura aproximadamente un minuto y generalmente se realiza en horas de la noche y durante el vuelo; los machos forman enjambres para facilitar la captura de las hembras que vuelan hacia ellos. Los huevos puestos por las hembras generalmente son fecundados por el espermatozoides del primer macho (Domínguez, 2003).

La duración del ciclo en *Anopheles albimanus* bajo condiciones naturales es poco conocida, en Puerto Rico el desarrollo de los estados pre-imagales tiene un rango de 7-9 días en verano y 21 días en invierno, sin embargo en crías de laboratorio, los estados de larva y pupa desarrollan de 7 a 15 días a temperaturas entre 20 -29 °C, mientras que entre 12- 15 °C no se desarrollan. Se ha determinado que la calidad del alimento influye tanto en la supervivencia como en el tiempo de desarrollo. A partir de 19 tipos de alimentos probados se encontró que la duración promedio del estado larval podía variar entre 8.62 y 16.66 días (González, 2005).

2.4.5 Hábitos Alimenticios

Los anophelinos se alimentan de una gran variedad de animales, esto depende primordialmente de la preferencia de una especie por el hospedero y de la disponibilidad de dichos hospederos. Los hospederos más comunes además del hombre, son los animales domésticos como el ganado, caballos, cerdos, ovejas y cabras. Las especies que prefieren alimentarse de los animales se denominan, zoofílicas, mientras que las que prefieren a los humanos se llaman antropofílicas.

Anopheles albimanus es generalmente zoofílica, pues solo del 15 al 20% se alimenta del hombre (Domínguez, 2003).

Es importante determinar el comportamiento relacionado con la búsqueda de alimentación sanguínea, pues se le considera un vector más efectivo si prefiere sangre humana (antropofílica), es así que unos entran a las casas a reposar (endofília) y alimentarse (endofágia), otros pican solo fuera de las casas (exofágia) y otros permanecen entre la vegetación o bosques (exofília) alimentándose de animales silvestres, pero eventualmente pueden picar al hombre, cuando este invade su ambiente natural (DIGESA, 2002).

Anopheles albimanus pica durante toda la noche, pero la mayor actividad ocurre entre el anochecer y la media noche, y durante este período hay un pico de actividad que puede variar con la estación del año, las condiciones atmosféricas y el lugar (Domínguez, 2003). En nuestro país se ha determinado que la máxima actividad de picaduras ocurre en el horario de 20:00 a 23:00 tanto dentro como fuera del domicilio (endofília-exofília), (Calderón *et al.*, 1995).

2.4.6 Hábitos de reposo

Los hábitos de reposo de *Anopheles albimanus* son relativos en cuanto a la selección de lugares; después de alimentarse en las casas puede reposar dentro de ellas, buscar otra vivienda o reposar en otros hábitats cerca de la vivienda (Foratini, 1962). Estudios realizados en México demostraron que las hembras después de picar, el 44 % de las hembras reposa en los techos, el 29% en las paredes y el 27% en los pisos, muebles u otros enseres domésticos (Domínguez, 2003).

2.5 MÉTODO DE CONTROL DE MOSQUITOS *Anopheles*

En la actualidad los métodos recomendados por la OMS para reducir la transmisión de malaria se basan exclusivamente en el control de los vectores, debido al desarrollo de resistencia contra las drogas anti maláricas por parte de los parásitos y a que aún no existe una vacuna disponible; esto incrementa la necesidad de utilizar otras medidas preventivas (Farenhost y Knols, 2007).

Los modelos epidemiológicos afirman que la forma más efectiva de reducir la transmisión de malaria es eliminando a los mosquitos, específicamente a las hembras. Todos los métodos implementados en regiones tropicales se basan en la aplicación de insecticidas dentro del domicilio y el uso de mosquiteros impregnados con insecticidas. Sin embargo la resistencia de los mosquitos *Anopheles* al DDT y los piretroides se viene incrementado en diferentes regiones endémicas del mundo (Campuzano y Blair, 2010). Por lo tanto, existe una creciente necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control de malaria que puedan complementar o reemplazar a los métodos de control existentes (Farenhost y Knols, 2007).

El control biológico es una de las formas más antiguas de control de plagas y este consiste en utilizar organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales, como los son los parasitoides (nematodos o virus), depredadores (peces larvivoros) y entomopatógenos (Vargas, 2003; García *et al.*, 2008). Los hongos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (Téllez *et al.*, 2009) y al no contaminar el medio ambiente, no ser tóxicos para los humanos y no desarrollar resistencia despiertan el interés de empresas y organismos de investigación (Farenhost y Knols, 2007).

Una alternativa que está teniendo buenos resultados para controlar mosquitos adultos Anopheles, es la aplicación de controladores biológicos (hongos entomopatógenos), (Blanford *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2005, 2006; Singh y Prakash, 2011). Las nuevas estrategias plantean la aplicación de biopesticidas conteniendo esporas de hongos, dentro de las viviendas, siendo la infección por contacto directo. Los estudios iniciales de este método, a nivel de laboratorio y en campo, muestran el potencial de algunos hongos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) de reducir la capacidad de transmisión de Malaria en mosquitos Anopheles (Blanford *et al.*, 2005).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Existen hongos que en hábitats naturales interactúan con mosquitos vectores de organismos que ocasionan enfermedades en los seres humanos; por lo que se logrará aislar hongos a partir de mosquitos *Anopheles albimanus*, identificarlos y determinar las cepas con posible potencial entomopatógeno basado en estudios previos.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo General:

Aislar e identificar cepas nativas de hongos a partir de especímenes del mosquito *Anopheles albimanus* colectados en criaderos artificiales ubicados en las localidades de Laramie y Verdun de la ciudad de Trujillo, departamento de La Libertad - Perú.

3.2.2 Objetivos específicos:

- a) Aislar hongos a partir de especímenes colectados de larvas, pupas y adultos del mosquito *Anopheles albimanus*.
- b) Evaluar las características morfológicas e identificar los géneros de los hongos aislados.
- c) Determinar las cepas de hongos con posible potencial entomopatógeno.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Localización de colecta de mosquitos *Anopheles albimanus*

La colecta de mosquitos se realizó en dos localidades de la ciudad de Trujillo, departamento de La Libertad-Perú: la localidad de Laramie, ubicada al sur de Trujillo en la provincia de Virú, Latitud Sur: 8°25'30" y Longitud Oeste: 78°46'47" y la localidad de Verdún, ubicada al noroeste de Trujillo en la provincia de Pacasmayo, Latitud Sur: 7°25'00" y Longitud Oeste: 79°30'00" (Fig. 1). Las larvas y pupas se colectaron en criaderos temporales, se escogieron como puntos de muestreo: canales de riego y drenes con vegetación flotante y emergente (totora y algas) en Laramie y sembríos de arroz inundados en Verdún

4.1.2 Procesamiento de muestras

Se colectaron larvas, pupas y adultos, los que se identificaron, seleccionaron y empacaron en el Laboratorio de Referencia Regional de Trujillo, perteneciente a la Gerencia Regional de Salud del departamento de La Libertad-Perú. La identificación de la especie se realizó con ayuda del personal técnico del Laboratorio de Referencia Regional de Trujillo.

El procesamiento de especímenes para el aislamiento y la posterior identificación de hongos entomopatógenos se realizó en el Laboratorio de Micología Aplicada, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Colecta de especímenes de *Anopheles albimanus*

Las colectas se realizaron los días 30 y 31 de Marzo 2012. Se ubicaron los puntos de muestreo (criaderos) con ayuda del personal de vigilancia entomológica del Laboratorio de referencia de regional de Salud de La Libertad, y se registraron las condiciones ambientales: temperatura del agua y humedad relativa, utilizando un termohigrómetro (*Cornwall*).

4.2.2 Colecta de larvas y pupas de *Anopheles albimanus*

La colecta de larvas y pupas se realizó entre las 8:00 y 12:00 pm, en el interior y exterior de los criaderos cuyas extensión fueron de 7 metros de largo por 2 metros de ancho (canal de riego) y de 50 metros de largo por 30 metros de ancho (sembrío de arroz); con ayuda de cucharones de plástico se tomó porciones de agua, evitando la formación de ondas; para visualizar las larvas el contenido fue vertido en bandejas de plástico. Los especímenes se extrajeron utilizando pipetas de plástico y se colocaron inmediatamente en frascos plásticos de 500 mililitros con agua del criadero hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad. Se colectó un total de 100 larvas. Las muestras se rotularon especificando la ubicación del criadero y la fecha de colecta. Los especímenes destinados para identificación se colectaron en viales de plástico con alcohol comercial (95%) (Fig. 2).

4.2.3 Colecta de adultos de *Anopheles albimanus*

La captura de adultos se llevó a cabo en el interior de las viviendas con aspiradores manuales, entre las 12:00 y 14:00 p.m. La búsqueda de especímenes se realizó utilizando una linterna, en paredes, techos y detrás de muebles (Fig. 3). Los mosquitos capturados se introdujeron en vasos colectores; en la parte superior de los vasos se colocó algodones húmedos para evitar la deshidratación. Todos los vasos se

rotularon con el nombre de la localidad y fecha de colecta. Las viviendas ubicadas en la localidad de Laramie, se encontraban a 300 metros de los criaderos y las viviendas ubicadas en la localidad de Verdún, se encontraban a 500 metros de los criaderos de larvas.

4.2.4 Identificaciones de muestras

Para la identificación, se utilizaron los especímenes conservados en alcohol (95%). En el caso de larvas, cada una se colocó en el centro de una lámina portaobjetos en posición dorsoventral; con la ayuda de un estilete fino, se separó la cabeza del cuerpo y los últimos segmentos del abdomen. La larva fue cubierta con *cellosolve* (Sigma®), se dejó evaporar casi todo el líquido, se colocó una gota de bálsamo de Canadá (Sigma®) y se cubrió con una laminilla de 22x22mm. El examen microscópico de las larvas se realizó en un microscopio compuesto (Olimpus®) con aumentos de 10 y 20X siguiendo la clave dicotómica “Clave Ilustrada para los Mosquitos Anofelinos de Sudamérica Occidental” elaborada por Gorham y colaboradores en 1973. No se identificaron pupas pues durante los muestreos no se llegaron a colectar.

Los adultos fueron colocados en la refrigeradora para adormecerlos. Se montaron sobre un alfiler entomológico adaptado para mosquitos, siguiendo la técnica descrita en el Manual de Campo para la Vigilancia Entomológica (DIGESA 2002). Se observaron macroscópicamente con la ayuda de un estereoscopio (LW Scientific®), y se identificaron siguiendo las claves dicotómicas de Wilkerson y Strickman en 1990 y de Calderón y colaboradores en 1995.

4.2.5 Aislamiento e identificación de los hongos

El aislamiento se realizó principalmente de especímenes que se encontraron muertos al momento de la colecta y de larvas, pupas y adultos muertos después de 5 días de colectados. Los especímenes se colocaron en placas de Petri estériles y procesadas mediante desinfecciones con Hipoclorito de sodio (Lejía) al 5% por 1 minuto para eliminar principalmente bacterias acompañantes en la superficie externa, luego se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril para finalmente colocar los especímenes en cámaras húmedas (placas de Petri con algodón humedecido) (Figura 4). Se incubó a temperatura ambiente realizando observaciones diarias. Los mosquitos con micelio se colocaron en placas de Petri con medio de cultivo Agar Extracto de Malta, y se realizaron siembras sucesivas hasta obtener cultivos puros.

Finalmente se realizaron microcultivos según lo descrito por Goettel e Inglis (1997) de los hongos aislados con la finalidad de identificar el género y/o especie. Las cepas identificadas fueron conservadas en viales con APD entre 2 - 4° C hasta su evaluación entomocida (Fig. 4).

Se asignaron códigos a las cepas, donde el criterio empleado fue: A por *Anopheles*, L/V por la localidad de Laramie o Verdun y luego un número que fue asignado en forma ascendente de acuerdo al aislamiento, adicionalmente se asignó cuando fue necesario, una letra en base al color de la colonia del hongo aislado (B: blanco, V: verde).

4.2.6 Caracterización morfológica de las cepas

Para la identificación de los hongos, se utilizó las características morfológicas, siguiendo la clave taxonómica descrita por Barnett y Hunter en 1998, y la clasificación taxonómica de Abarca (2000), Rotem (1994), Simmons (1995) y Nelson *et al.* (1983).

Para describir las estructuras microscópicas, se realizaron microcultivos en placas Petri utilizando cubos pequeños de AEM; en cada placa de Petri estéril, se colocó una lámina portaobjetos con dos cubos de agar. Utilizando un asa de siembra en ángulo recto se tomó una pequeña porción de micelio, se sembró en cada lado del cubo de agar y se colocó una laminilla cubreobjetos sobre cada cubo de agar. Para dar las condiciones de humedad se colocó un algodón húmedo en el interior de la placa Petri, perpendicularmente a la lámina y fueron mantenidas a temperatura ambiente. Una vez evidenciado el crecimiento del hongo, los cubreobjetos fueron retirados y colocados sobre una lámina portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. Se retiraron los dos cubos de agar y se colocó una gota de azul de lactofenol en cada lugar correspondiente a los cubos sobre la lámina portaobjetos cubriéndola con dos nuevos cubreobjetos. Utilizando una pinza fina, se realizó una ligera presión para eliminar el exceso de colorante utilizando un papel absorbente, cada cubreobjetos se selló con esmalte de uñas. Cada montaje fue observado con un microscopio (LW Scientific®) a 40X de aumento.

5. RESULTADOS

5.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

Se procesaron un total de 40 larvas, 56 adultos y 3 pupas de *Anopheles albimanus*, de los cuales se aislaron un total de 32 cepas de hongos, 17 de hongos saprofitos pertenecientes a los géneros *Nigrospora*, *Cladosporium* y *Bipolaris*, y 15 con potencial entomopatógeno sobre larvas de culícidos, estas pertenecen a los géneros *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Alternaria*.

De ellos 8 cepas (25%) pertenecen al género *Nigrospora*, 6 (19%) a *Cladosporium*, 5 (16%) a *Acremonium*, 5 (16%) a *Fusarium*, 3 (9%) a *Aspergillus*, 3 (9%) a *Bipolaris*, y 2 (6%) a *Alternaria* (Fig. 5).

De los hongos identificados como posibles potenciales entomopatógenos; el 66% (10/15) se aisló de adultos, los géneros fueron *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Alternaria*. El 27% (4/15) de larvas, los géneros fueron *Acremonium* y *Fusarium* y el 7% (1/15) a partir de pupas, el género fue *Aspergillus* (Fig. 6).

El aislamiento de hongos con posible potencial entomopatógeno, a partir de mosquitos (larvas, pupas y adultos) obtenido en la localidad de Verdun fue de 24 cepas y en la localidad de Laramie fue de 8 cepas. En Laramie se obtuvo 6 cepas aisladas de larvas (*Acremonium*, *Fusarium* y *Bipolaris*) y 2 de adultos (*Aspergillus* y *Cladosporium*) y en Verdun se lograron aislar 22 cepas de adultos (*Nigrospora*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Bipolaris*), 1 de larvas (*Fusarium*) y 1 de pupas (*Aspergillus*) (Fig. 7).

5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Las observaciones de las estructuras microscópicas se realizaron bajo aumentos de 40X y 100X bajo un microscopio y utilizando azul de lactofenol como colorante. Se consideró únicamente las cepas de hongos con posible potencial entomopatógeno.

5.2.1 Caracterización morfológica de la cepa *Fusarium sp* (AL-2m)

Las colonias presentaron micelio de aspecto algodonoso, plana de crecimiento ilimitado, de color blanco al inicio, tornándose naranja al tercer día. Produjo un pigmento de color naranja oscuro difusible en el medio

Al microscopio se observaron hifas hialinas delgadas y septadas, abundantes macroconidios hialofragmas fusiformes de 3 a 5 células y septados. También fiálides finas con microconidios elipsoidales acumulados en la punta formando falsas cabezas; características que corresponden al género *Fusarium sp*. (Fig. 8).

5.2.2 Caracterización morfológica de la cepa *Fusarium sp* (AL-10)

Las colonias presentaron micelio de color blanco al inicio, de aspecto algodonoso, elevado e ilimitado. Se tornó de color naranja al cuarto día y el pigmento difundió al medio de cultivo.

Al microscopio se observaron hifas hialinas septadas y delgadas, abundantes macroconidios hialofragmas fusiformes de 3 a 5 células y septados, características que corresponden al género *Fusarium sp*. (Fig. 9).

5.2.3 Caracterización morfológica de la cepa *Fusarium sp* (Lv-1)

Las colonias presentaron micelio de color blanco al inicio, la misma que se tornó amarillo-naranja al tercer día, de aspecto algodonoso, plana e ilimitada. La cepa produjo un pigmento difusible en el medio de color amarillo oscuro.

Al microscopio se observaron hifas hialinas septadas y delgadas, abundantes macroconidios fusiformes de 3 a 5 células, hialinos y septados agrupados sobre las hifas; características que corresponden al género *Fusarium sp*. (Fig. 10).

5.2.4 Caracterización morfológica de la cepa *Fusarium oxysporum* (Av-21)

Las colonias presentaron micelio de aspecto algodonosa de color blanco al inicio, tornándose purpura al cuarto día, planas e ilimitadas. La cepa produjo un pigmento difusible en el medio de color violeta oscuro.

Al microscopio se observaron hifas hialinas septadas y delgadas, abundantes macroconidios hialofragmas fusiformes de 3 a 5 células y septados. También fiálides finas con microconidios elipsoidales acumulados en la punta de la fiálide formando falsas cabezas; características que corresponden al género *Fusarium oxysporum* (Fig.11).

5.2.5 Caracterización morfológica de la cepa *Fusarium sp*. (Av-28)

Las colonias presentaron micelio de aspecto algodonosa de color blanco al inicio, tornándose rosada al 3 día, planas e ilimitadas. La cepa produjo un pigmento difusible en el medio de color rosa-salmón; estas características correspondieron al género *Fusarium sp*.

Al microscopio se observaron hifas hialinas septadas y delgadas, abundantes macroconidios fusiformes, hialinos y septados. Se observó también fiálides finas con microconidios elipsoidales acumulados en la punta de la fiálide formando falsas cabezas; características que corresponden al género *Fusarium* sp (Fig. 12).

5.2.6 Caracterización morfológica de la cepa *Acremonium* sp. (AL-2a)

Las colonias presentaron micelio de color blanco, de aspecto aterciopelado, plano e ilimitado.

Al microscopio se observaron hifas finas, hialinas y septadas. Se observó la presencia de fiálides no ramificadas, solitarias y estrechas en el ápice, donde se encuentran agrupados los conidios y hialinos. Estas características pertenecen al género *Acremonium*, siendo identificado como *Acremonium* sp. (Fig. 13).

5.2.7 Caracterización morfológica de la cepa *Acremonium* sp. (Av1-b)

Las colonias presentaron micelio de color blanco, de aspecto aterciopelada y algodonosa, planas e ilimitadas.

Al microscopio se observaron hifas finas, hialinas y septadas. Se observó la presencia de fiálides no ramificadas, solitarias y estrechas en el ápice, donde se encuentran agrupados los conidios fusiformes y hialinos. Estas características pertenecen al género *Acremonium*, siendo identificado como *Acremonium* sp. (Fig. 14).

5.2.8 Caracterización morfológica de la cepa *Acremonium* sp. (Av-10)

Las colonias presentaron micelio de color blanco al inicio, luego de 4 días se tornaron de un color gris claro, de aspecto aterciopelado y algodonosa, planas e ilimitadas.

Al microscopio se observaron hifas finas, hialinas y septadas. Se observó la presencia de fiálides no ramificadas, solitarias y estrechas en el ápice, donde se encuentran agrupados los conidios fusiformes y hialinos, también se observaron conidios sueltos en cadenas. Estas características pertenecen al género *Acremonium*, siendo identificado como *Acremonium sp.* (Fig. 15).

5.2.9 Caracterización morfológica de la cepa *Acremonium sp.* (Av-13)

Las colonias presentaron micelio de color blanco al inicio, de textura aterciopelada y algodonosa, plana e ilimitada.

Al microscopio se observaron hifas finas, hialinas y septadas. Se observó la presencia de fiálides no ramificadas, solitarias y estrechas en el ápice, donde se encuentran agrupados los conidios fusiformes y hialinos, también se observaron conidios sueltos o en cadenas. Estas características pertenecen al género *Acremonium*, siendo identificado como *Acremonium sp.* (Fig. 16).

5.2.10 Caracterización morfológica de la cepa *Acremonium sp.* (Av-23a)

Las colonias presentaron micelio de color blanco, con pigmentación del medio en color rosa pálido, de textura aterciopelada y algodonosa, planas e ilimitadas.

Al microscopio se observaron hifas finas, hialinas y septadas. Se observó la presencia de fiálides no ramificadas, solitarias y estrechas en el ápice, donde se encuentran agrupados los conidios fusiformes y hialinos, también se observaron conidios sueltos. Estas características pertenecen al género *Acremonium*, siendo identificado como *Acremonium sp.* (Fig. 17).

5.2.11 Caracterización morfológica de la cepa *Aspergillus niger* (AL-12)

Las colonias presentaron micelio de color negro, de textura granular, planas e ilimitadas, que al inicio fueron de color blanco; el micelio era poco visible. No se observó pigmento difusible.

Al microscopio se observaron las cabezas conidiales biseriadas y radiales; conidióforos de paredes gruesas, lisas, hialinos, de color marrón claro cerca de la vesícula. Las vesículas subesféricas de color café claro y las métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Bajo aumento de inmersión de 100x se observaron conidios globosos de 3.5 – 5 µm de diámetro, de color café, rugosos y con crestas irregulares. Estas características pertenecen al género *Aspergillus*, siendo la especie identificada como *Aspergillus niger* (Fig. 18).

5.2.12 Caracterización morfológica de la cepa *Aspergillus flavus* (Av-20b)

Las colonias presentaron micelio de verde oliváceo a verde amarillento; micelio blanco poco visible, de textura variable, inicialmente flocosas, tornándose en pulverulentas e ilimitadas. No se observó pigmento difusible.

Al microscopio se observaron las cabezas conidiales uniseriadas y biseriadas, la mayoría radiales; conidióforos de paredes gruesas, lisas, hialinos; las métulas ocupando casi toda la superficie de la vesícula. Bajo aumento de inmersión de 100x se observaron conidios de 3.5 µm de diámetro, de color verde amarillento, globosos, equinulados y ligeramente rugosos. Estas características pertenecen al género *Aspergillus*, siendo la especie identificada como *Aspergillus flavus* (Fig. 19).

5.2.13 Caracterización morfológica de la cepa *Aspergillus niger* (Pv-1)

Las colonias presentaron micelio de color negro, de textura granular, planas e ilimitadas, que al inicio fueron de color blanco; el micelio era poco visible. No se observó pigmento difusible.

Al microscopio se observaron las cabezas conidiales biseriadas y radiales; conidióforos de paredes gruesas, lisas, hialinos, de color marrón claro cerca de la vesícula. Las vesículas subesféricas de color café y las métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Bajo aumento de inmersión de 100x se observaron conidios globosos de 3,5 – 4 μm de diámetro, de color café y rugosos. Estas características pertenecen al género *Aspergillus*, siendo la especie identificada como *Aspergillus niger* (Fig. 20).

5.2.14 Caracterización morfológica de la cepa *Alternaria alternata* (Av-19)

Las colonias presentaron micelio de color verde grisáceo, planas, de aspecto algodonoso. Se observó producción de pigmentos negros difusibles en el medio de cultivo.

Al microscopio se observaron hifas septadas dematiáceas. Conidióforos septados, de color café, con apariencia en forma de zigzag. Los conidios de color café, muriformes, con septos transversales (3-7) y longitudinales (0-1), solitarios, acropétalos y con ornamentación rugosa. Estas características identifican al género *Alternaria*, siendo identificada como *Alternaria alternata* (Fig. 21).

5.2.15 Caracterización morfológica de la cepa *Alternaria alternata* (Av-30)

Las colonias presentaron micelio de color verde grisáceo, planas, de aspecto algodonoso. Se observó producción de pigmentos negros difusibles en el medio de cultivo.

Se observaron hifas septadas dematiáceas. Conidióforos septados, de color café, con apariencia en forma de zigzag. Los conidios de color café, muriformes, con septos transversales (3-4) y longitudinales (0-1), solitarios, acropétalos y con ornamentación rugosa. Estas características pertenecen al género *Alternaria*, siendo identificada como *Alternaria alternata* (Fig. 22).

6. DISCUSIÓN

6.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

De todo el material obtenido de los muestreos en las localidades de Verdún y Laramie, el 47% de aislamientos fue debido a una infección fúngica natural en las diferentes etapas evolutivas del mosquito *Anopheles albimanus*, (larvas, pupas y adultos infectados con géneros de hongos entomopatógenos determinados en las investigaciones citadas). En el 53% de aislamientos se identificó como hongos saprófitos (*Cladosporium sp.*, *Bipolaris sp.* y *Nigrospora sp.*), esto puede explicarse debido a los hábitos de los adultos de este vector; las hembras se alimentan tanto del hombre como de animales; la zoofagia puede realizarse fuera de las casas, por lo tanto utilizan la vegetación colindante a las casa para reposar; esto favorece que las esporas o conidios de hongos fitopatogenos se adhieran a la cutícula de sus cuerpos, de acuerdo a los estudios de Vargas (1961) en Costa Rica.

De los 33 aislamientos obtenidos a partir de adultos, larvas y pupas, se obtuvieron un total de 15 cepas (46%) correspondientes a los géneros: *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Acremonium*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pereira *et al.*, (2009) en el estudio que realizó en la amazonia de Brasil, determinó que los géneros de hongos filamentosos: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Acremonium* y *Penicillium*, se encuentran asociados a larvas de mosquitos culícidos en la naturaleza.

En la localidad de Laramie se aislaron un total de 3 cepas de hongos a partir de larvas, mientras que en la localidad de Verdun, solo se aisló una cepa. En Laramie se obtuvo el menor número de hongos de los adultos; esto va directamente relacionado al tipo de criadero encontrado en la localidad de Laramie, al ser más pequeño, permite que los conidios permanezcan en concentraciones elevadas, capaces de infectar a larvas y ocasionarles la muerte; mientras que el criadero en Verdun (sembrío de arroz), podría

estar facilitando a la dispersión de los conidios, por lo que la muerte del mosquito no se dio en la etapa de larva sino en las pupas o adultos.

6.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Las cepas aisladas; AL-12, Av-20b y Pv-1 se identificaron como hongos del genero *Aspergillus*, basados en la caracterización morfológica macroscópica y microscópica. Se logró identificar a las cepas AL-12 y Pv-1 como *Aspergillus niger* y a la cepa Av-20b como *Aspergillus flavus*. Los resultados obtenidos permiten confirmar la existencia de la interacción natural entre este género y larvas de culícidos vectores de enfermedades tropicales, de igual manera Pereira *et al.* (2009), aisló *Aspergillus sydowii* a partir de larvas de *Aedes fluviatilis*; Nnakumusana (1985) también aisló *Aspergillus parasiticus* a partir de larvas moribundas de *Anopheles gambiae* y al enfrentarlas en el laboratorio obtuvo 100% de mortalidad.

La capacidad entomopatógena del genero *Aspergillus* ha sido confirmada por Moraes *et al.* (2001) quien demostró que conidios de *A. flavus* causan retraso en el desarrollo larval de *Culex quinquefasciatus* y en el caso de las larvas de *Aedes fluviatilis* causan más del 50% de mortalidad. Adicionalmente se sabe que el hongo *Aspergillus fumigatus* y *A. niger* tienen la capacidad de sintetizar proteasas extracelulares, enzimas que participan durante el proceso infectivo de insectos, degradando la cutícula, compuesta por quitina y otros componentes (Monod *et al.*, 2002).

Las especies de *Fusarium* son saprofitos o parásitos de plantas; y se les puede encontrar en la misma planta o en el suelo (Pereira *et al.*, 2009), sin embargo también se tiene referencias de la interacción natural que existe entre este género y larvas de culícidos; Saunders *et al.* (1988) realizó el aislamiento de *Fusarium oxysporum*, a partir de larvas muertas de *Aedes sierrensis*. Scholte *et al.* (2004), realizó una revisión de las investigaciones que reportan la presencia de *Fusarium oxysporum* en larvas de

Ae. cantans, Pereira *et al.* (2009) aisló *Fusarium spp.* a partir de larvas de *Mansonia titillans*. Prakash *et al.* (2010) determinó la patogenicidad de metabolitos (toxinas) producidos por *Fusarium oxysporum* en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles stephensi* bajo condiciones controladas de laboratorio; se probaron diferentes concentraciones y se pudo determinar que la mayor patogenicidad se logró después de 48 horas de exposición siendo el primer estadio más susceptible que el segundo y tercero. Los resultados del presente trabajo coinciden con las investigaciones anteriores pues se logró aislar este género a partir de mosquitos *Anopheles albimanus* (larvas y adultos) (cepas: AL-2m, AL-10, Lv-1, Av-21 y Av-28) con lo que se estaría confirmando la interacción natural sobre mosquitos culícidos.

Con respecto al género *Acremonium*, reportamos el aislamiento de 5 cepas (AL-2a, Av-1b, Av-10, Av-13 y Av-23a) a partir de larvas y adultos de *Anopheles albimanus*. Las especies de este género son cosmopolitas y descomponedores de materia orgánica, sin embargo algunas especies son contaminantes y se les ha encontrado parasitando insectos y hongos (Pereira *et al.*, 2009). Se sabe que este género tiene la capacidad de producir enzimas del tipo glucanasas, que degradan los β -1,3 glucanos, principales componentes de la pared celular de los hongos, como parte de la interacción con compuestos de la cutícula de insectos o pared celular de hongos (Franco *et al.*, 2011). Pereira *et al.* (2009) realizó el primer reporte de la asociación de *Acremonium kiliense* en larvas de *Mansonia titillans*, sin embargo cabe resaltar que se ha reportado la presencia de *Acremonium bacillisporum* en cadáveres de culícidos no identificados, recolectados en hábitats subterráneos de la República Checa (Kubátová y Devořák, 2005), si bien es cierto no se pudo determinar las especies definitivas, nuestros resultados confirman la relación (patógeno-hospedero) entre el género *Acremonium* y larvas de mosquitos culícidos.

Las especies de *Alternaria* son consideradas generalmente como saprófitas o eficientes fitopatógenos, causantes de enfermedades en una variedad de plantas. Existe mayor cantidad de información disponible sobre el uso de *Alternaria spp* como entomopatógenos o como agentes de control biológico de insectos plaga como: áfidos, coleópteros, larvas de lepidópteros y trips; sin embargo se ha reportado el aislamiento de *Alternaria sp.* a partir de larvas del tercer y cuarto estadio de *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* (Sharma y Sharma, 2014). En nuestro estudio se obtuvo dos cepas identificadas como *Alternaria alternata* (Av-19 y Av-30) a partir de adultos de *Anopheles albimanus*; esto confirma la interacción entre *Alternaria spp.* y larvas de mosquitos culícidos, la misma que puede evidenciarse en la etapa adulta.

7. CONCLUSIONES

1. El método aplicado para la desinfección de la superficie de los especímenes, es efectivo para eliminar bacterias del medio y aislar hongos filamentosos.
2. Se logró evaluar morfológicamente e identificar las cepas de hongos filamentosos con posible potencial entomopatógeno.
3. Del total de cepas se considera que el 25% podría tener potencial entomopatógeno.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar las cepas aisladas en el presente trabajo para realizar pruebas de patogenicidad en larvas de cuarto estadio de *Anopheles albimanus*.

Se recomienda utilizar las cepas de *Fusarium sp.* (AL-2m, AL-10, Lv-1) y *Acremonium sp.* (AL-2a) en bioensayos de patogenicidad en larvas.

Se recomienda utilizar las cepas de *Fusarium sp.* (Av-28), *Fusarium oxysporum* (Av-21), *Acremonium sp.* (Av1-b, Av-10, Av-13 y Av-23a), *Aspergillus niger* (AL-12 y Pv-1), *Aspergillus flavus* (Av-20b) y *Alternaria alternata* (Av-19 y Av-30) en bioensayos de patogenicidad en adultos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la Aspergilosis nosocomial. Revista Iberoamericana de Micología 17: 79-84.
- ARREDONDO J. 1990. "Ecología larvaria de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) en el sur De Chiapas, México". Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, pagina 3.
- BARNETT H. Y B. HUNTER. 1998. Illustred genera of imperfect fungi. Fourth edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, USA. 218pp.
- BEJARANO E. 2003. Occurrence of the Malaria Vector *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) in Isla Fuerte, Colombia. Neotropical Entomology 32(3): 517-518.
- BLANCO S., A. MARTÍNEZ, O. CANO, R. TELLO Y I. MENDOZA. 2000. Introducción del *Bacillus sphaericus* Cepa-2362 (GRISELESF) para el control biológico de vectores maláricos en Guatemala. Rev Cubana Med Trop 52(1): 37-43.
- BLANFORD S., B. CHAN, N. JENKINS, D. SIM, R. TURNER, A. READ Y M. THOMAS. 2005. Fungal pathogen reduces potencial for malaria transmission. Science 308(5728): 1638-1641.
- CALDERON G., R. FERNÁNDEZ Y J. VALLE. 1995. Especies de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Perú. Revista Peruana de Epidemiología 8(1): 5-23.
- CAMPUZANO, G. Y S. BLAIR. 2010. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. Medicina & Laboratorio 16: 311-354.

- CRUZ C., J. VALLE Y A. RUIZ. 2004. Determinación de los hábitos de *An. pseudopunctipennis* y *An. calderoni* en dos localidades del valle de Chao. La Libertad, Perú. Rev Perú Med Exp Salud Pública 21(4): 223-230.
- DIERMISSEN E. Y C. YAEGER. 2008. Malaria (Revisión Bibliográfica). Revista médica de Costa Rica y Centroamérica 582: 77-81.
- DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD AMBIENTAL. 2002. Manual de Campo para la Vigilancia Entomológica. Primera edición. 142pp.
- DOMÍNGUEZ M. 2003. "Evaluación del piretroide Bifentrina, sobre cambios conductuales de *Anopheles albimanus* Wiedemann Díptera (Culicidae), mediante el rociado intradomiciliario en sur del estado de Quintana Roo México". Tesis como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias con Especialidad en Entomología Medica. Universidad Autónoma De Nuevo León, páginas: 3 – 27.
- FARAN M. 1980. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus Nyssorhynchus of Anopheles. Contributions of the American Entomological Institute 15(7): 1–215.
- FARENHORST M. Y B. KNOLS. 2007. Fungal entomopathogens for the control of adult mosquitoes: A look at the issues. Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet 18: 51-59.
- FORATTINI O. 1962. Entomología Médica. Primera edición. 662pp.
- FRANCO K., S. RODRÍGUEZ, J. CERVANTES Y J. BARRANCO. 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. Soc. Rural. Prod. Medio Ambiente 11(22): 143-160.

- GARCIA A. 2011. Hongos entomopatógenos (Mycota: Deuteromycetes) aislados en el noroeste de México: Impacto sobre la longevidad, fecundidad, fertilidad y tasas de cópula e inseminación en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma De Nuevo León.
- GARCIA M., S. CAPPELLO, J. LESHER Y R. MOLINA. 2008. Hongos Entomopatógenos como una alternativa en el control Biológico. Kuxulkab Revista de Divulgación 15(27): 25-28.
- GOETTEL M. Y D. INGLISH. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In L. Lacey (edit). Manual of Techniques in Insect Pathology. London, Academic Press. Section 5: 213-249.
- GONZÁLES R. 2005. Efecto del criadero sobre la duración del ciclo de vida y productividad de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Díptera: Culicidae). Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle 6(1): 1-6.
- GORHAM J., C. STOJANOVICH Y H. SCOTT. 1973. Clave Ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamérica occidental. Mosquito Systemics 5(2): 97-156.
- INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 2003. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Malaria. Serie de Normas Técnicas N° 39. Lima.
- KUBÁTOVÁ A. Y L. DEVOŘÁK. 2005. Entomopathogenic fungi associated with insect hibernating in underground shelters. *Czech Mycology* 57(3-4): 221-237.
- MINISTERIO DE SALUD. 2011. Plan de Implementación de la Estrategia de Riego con Secas Intermitentes en el Cultivo de Arroz para el Control Vectorial de la Malaria en Regiones Priorizadas del Perú: R.M. N° 730-2010/MINS. Primera edición. 338pp.

- MOLINARO, E. M. CAPUTO, L. AMENDOEIRA. 2009. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: Rio de Janeiro: EPSJV; IOC. 290 pp. Volume 1.
- MONOD M., S. CAPOCCIA, B. LÉCHENNE, C. ZAUGG, M. HOLDOM Y O. JOUSSON. 2002. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 405-419.
- MONZÓN A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integral de Plagas*. (CATIE, Costa Rica) 63:95-103.
- MORAES A., G. COSTA, M. CAMARGO, R. OLIVEIRA Y P. OLIVEIRA. The entomopathogenic potential of *Aspergillus spp* in mosquitoes vectors of tropical diseases. *Journal of Bask Microbiology* 41: 45-49.
- NELSON P., T. TOUSSOUN Y W. MARASAS. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. USA. 193pp.
- NNAKUMUSANA E. 1985. Laboratory infection of mosquito larvae by entomopathogenic fungi with particular reference to *aspergillus parasiticus* and its effects on fecundity and longevity of mosquitoes exposed to conidial infections in larval stages. *Current Science* 54(23): 1221-1228.
- PEREIRA E., M. DE M. SARQUIS, R. FERREIRA-KEPPLER, N. HAMADA Y Y. ALENCAR. 2009. Filamentous Fungi Associated with Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae) in Municipalities of the Brazilian Amazon. *Neotropical Entomology* 38(3):352-359.

- PRAKASH S., G. SINGH, N. SONI Y S. SHARMA. 2010. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* against the larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Anopheles stephensi* (Liston) in laboratory. Parasitol Res 107: 651-655.
- PURIZACA M. 2008. Malaria en la Gestación. Revista peruana de Ginecología y Obstetricia 54: 131-142.
- PUTZKE J. Y M. PUTZKE. 1998. Os reinos dos fungos. EDUNISC, Santa Cruz do Sul, (1): 606p.
- RODRÍGUEZ M., A. ULLOA Y J. RAMSEY. 2008. Manual para la vigilancia y el control del paludismo en Mesoamérica. Primera edición. 2008pp.
- ROTEM J. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. American Phytopathological Society. St Paul, MN. USA. 326 p.
- SÁNCHEZ C. Y S. DURAND. 2004. Costo efectividad del cambio de los esquemas de Tratamiento para malaria en el Perú (1999-2003). Rev Perú Med Exp Salud Pública 21(4): 197-209.
- SAUNDERS G., J. WASHBURN, D. EGERTER Y J. ANDERSON. 1988. Pathogenicity of Fungi Isolated from Field-Collected Larvae of The Western Treehole Mosquito, *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae). Journal of Invertebrate Pathology 52(2): 360-363.
- SCHOLTE E., B. KNOLS, R. SAMSON Y W. TAKKEN. 2004. Entomopathogenic Fungi for Mosquito Control: A review. Journal of Insect Science 4:19.

- SCHOLTE E., B. KNOLS Y W. TAKKEN. 2006. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal Invertebrate Pathology* 91: 43-49.
- SCHOLTE E., K. NG'HABI, J. KIHONDA, W. TAKKEN, K. PAAIJMANS, S. ABDULLA, G. KILLEEN Y B. KNOLS. 2005. An Entomopathogenic Fungus for Control of Adult African Malaria mosquitoes. *Science* 308:1641–164.
- SHARMA I. Y A. SHARMA. 2014. Use of *Alternaria* Spp as a Pest Control Agent: A Review. *World Applied Sciences Journal*, 31(11): 1869-1872.
- SIMMONS E. 1995. *Alternaria* themes and variations (112-144). *Mycotaxon* 55: 55-163.
- SINGH G. Y S. PRAKASH. 2011. Evaluation of culture filtrates of *Culicinomyces clavisporus*: Mycoadulticide for *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res* 110 (1): 267-272.
- TÉLLEZ A., M. GUADALUPE, Y. MERCADO, A. ASAFF Y A. ARANA. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* 30: 73-80.
- VARGAS F., O. CÓRDOVA & A. ALVARADO. 2006. Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 23(4): 259-264.
- VARGAS J. 2003. Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología* 11(1): e5.

- VARGAS M. 1961. Algunas observaciones sobre los hábitos de *Anopheles* (N) *albimanus* y *Anopheles* (A) *punctimacula* adultos, en la localidad de Matapalo (Puntarenas) Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 9(2): 153-1 70.
- VYAS N., K. DUA & S. PRAKASH. 2007. Efficacy of *Lagenidium giganteum* metabolites on mosquito larvae with reference to nontarget organisms. Parasitol Res 101: 385-39.
- WILKERSON R. & D. STRICKMAN. 1990. Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of Central America and México. Journal of the american Mosquito Control Association 6(1): 7-34.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2012. World Malaria Report: 2012. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/

10. ANEXOS

Tabla 1. Origen de las cepas aisladas.

Código	Cepa	Localidad	Hospedero
AL-1	<i>Bipolaris sp</i>	Laramie, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , larva 2012
AL-2a	<i>Acrem onium sp</i>	Laramie, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , larva 2012
AL-2m	<i>Fusarium sp</i>	Laramie, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , larva 2012
AL-4N	<i>Bipolaris sp</i>	Laramie, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , larva 2012
AL-11m v	<i>Cladosporium sp</i>	Laramie, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
AL-12	<i>Aspergillus sp</i>	Laramie, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
AL-13	<i>Nigrospora sp</i>	Laramie, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , larva 2012
AL-10	<i>Fusarium sp</i>	Laramie, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , larva 2012
AL-9	No se identifico	Laramie, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , larva 2012
Avi	No se identifico	Verdún, La Libertad, Perú Ave	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
	No se identifico	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-1	<i>Acrem onium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-2	<i>Cladosporium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-3	<i>Nigrospora sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-4	<i>Cladosporium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-5	<i>Nigrospora sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-6	No se identifico	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-7	<i>Nigrospora sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-8	No se identifico	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-9	<i>Nigrospora sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-10	<i>Acrem onium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Lv-1	<i>Fusarium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , larva 2012
Av-12	No se identifico	Verdún, La Libertad, Perú Av-	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
13	<i>Acrem onium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú Av-	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
15	No se identifico	Verdún, La Libertad, Perú Av-	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
17	No se identifico	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-18	<i>Nigrospora sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-19	<i>Alternaria sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-20a	<i>Bipolaris sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-20b	<i>Aspergillus sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-21	<i>Fusarium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-22	<i>Cladosporium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú Av-	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
23a	<i>Acrem onium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú Av-	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
23b	<i>Nigrospora sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-24	<i>Cladosporium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-26	<i>Cladosporium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú Av-	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
29	No se identifico	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Pv-1	<i>Aspergillus niger</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Pupa 2012
Av-27	<i>Nigrospora sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-28	<i>Fusarium sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012
Av-30	<i>Alternaria sp</i>	Verdún, La Libertad, Perú	<i>Anopheles alb imanus</i> , Adulto 2012



Figura 1. Mapa de la ciudad de Trujillo. Resaltan las provincias de Virú y Pacasmayo y las localidades respectivas en la que se realizaron las colectas de los mosquitos *Anopheles albimanus*. Fuente 2015 Google Mapas.



Figura 2. Colecta de larvas de *Anopheles albimanus*. a) Criadero temporal (canal de riego). b) Criadero permanente (sembrió de arroz).



Figura 3 Colecta de adultos de *Anopheles albimanus*.

a) Las viviendas ubicadas a 300 metros de los criaderos de larvas. **b)** Las viviendas ubicadas a 500 metros de los criaderos de larvas.



Figura 4. a) Cámara húmeda de larvas de *A. albimanus* muertas. b) Cámara húmeda a adultos de *A. albimanus* muertos. c) Hongo cubriendo larva de *A. albimanus*. d) Hongo cubriendo completamente un adulto de *A. albimanus*. e) Hongo aislado. f) Microcultivo del hongo aislado para su identificación.

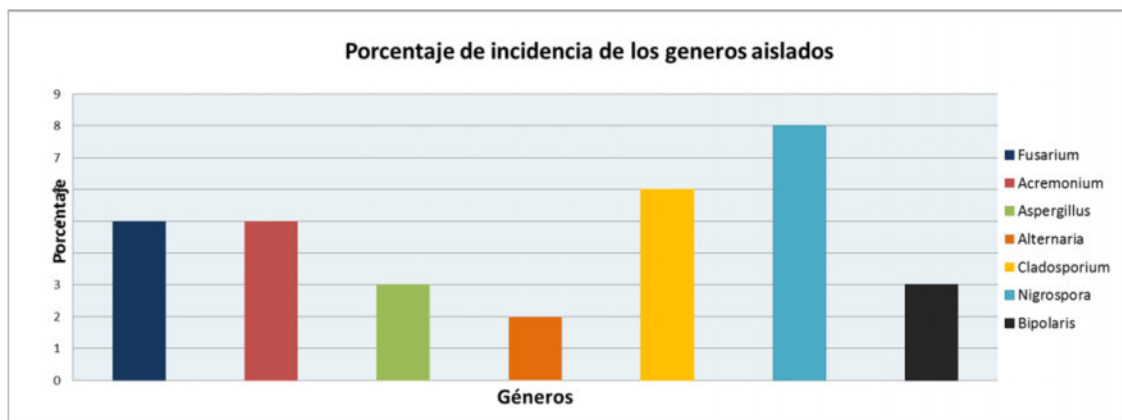


Figura 5. Incidencia de los géneros de hongos aislados de mosquitos *Anopheles albimanus*.

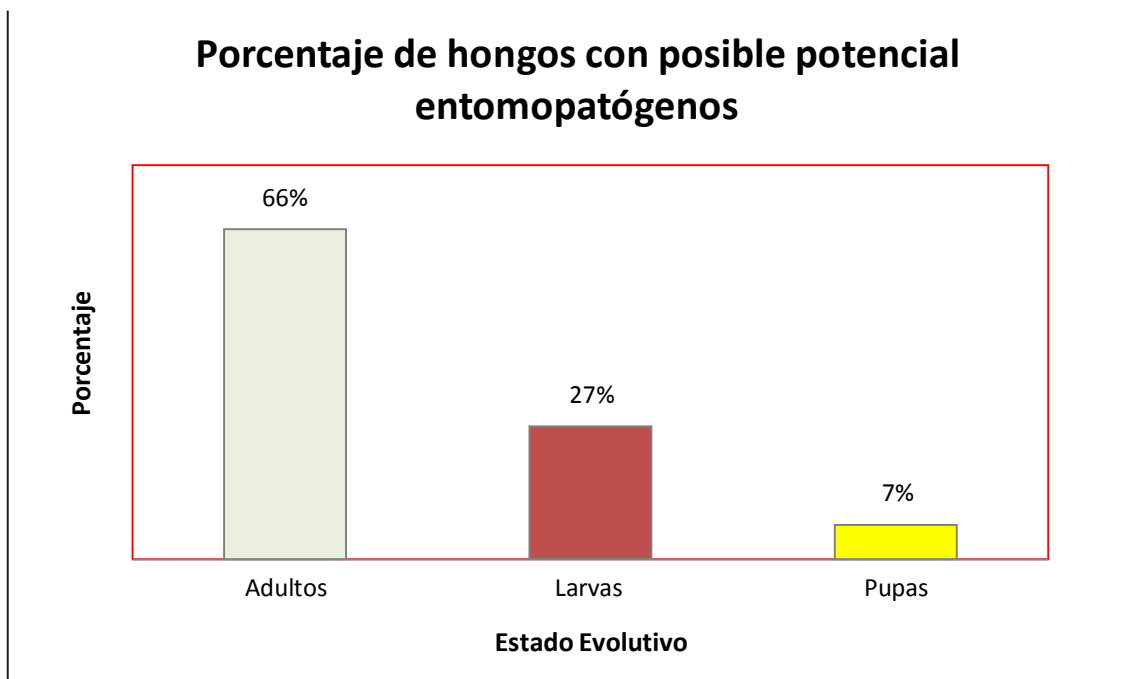


Figura 6. Porcentaje de cepas con posible potencial entomopatógeno por estado evolutivo del mosquito *Anopheles albimanus*: larvas, pupas o adultos.

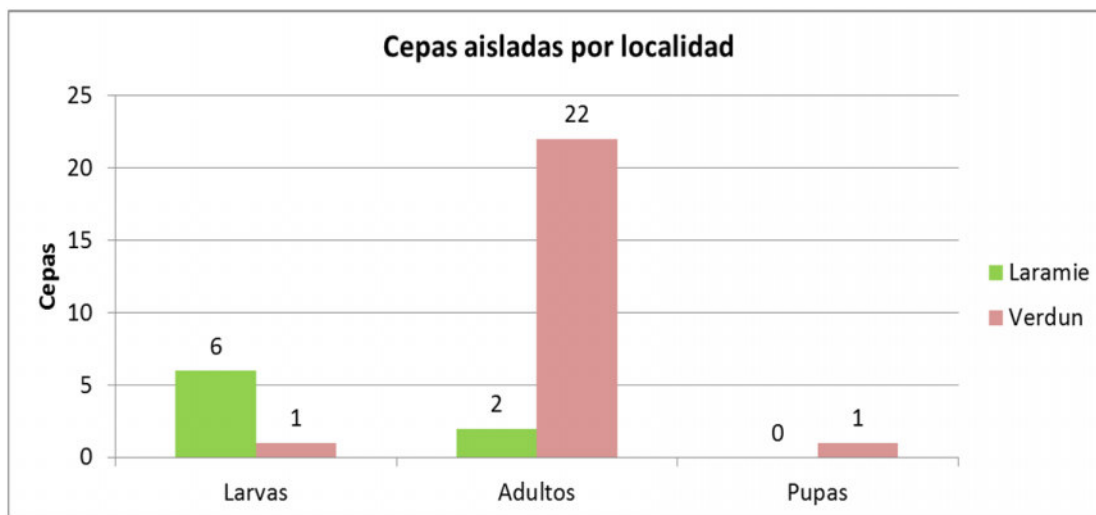
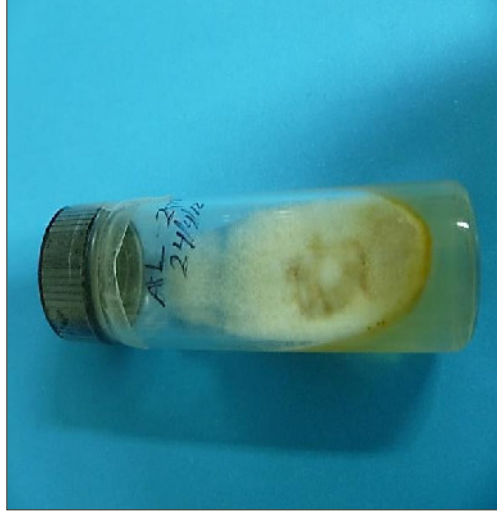


Figura 7. Cantidad de cepas de hongos con potencial entomopatígeno aislados de larvas, pupas y adultos colectados en las localidades de Laramie y Verdun, La Libertad – Perú. 2012.



a)



b)



c)

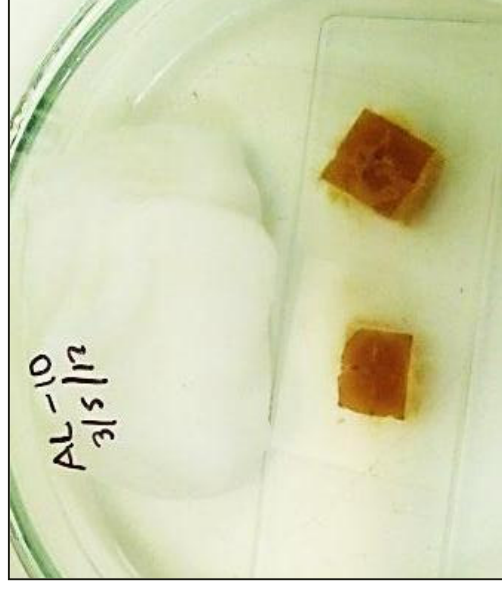


d)

Figura 8 Morfología de *Fusarium* sp. (AL-2m): a) aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento difusible en el medio. c) Vista en aumento (40X), hifas hialinas y macroconidios fusiformes y septados. d) Vista en aumento (100X), filídes con microconidios aglomerados a manera de cabeza.



a)

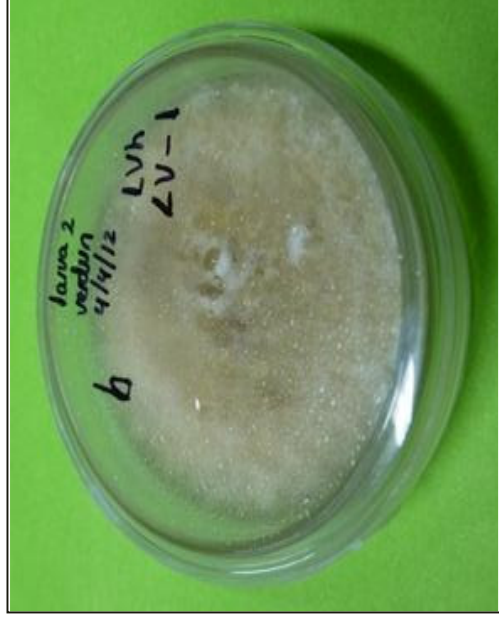


b)

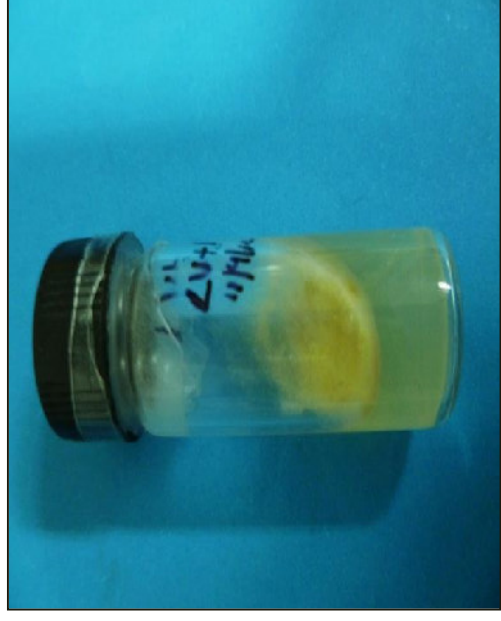


c)

Figura 9 morfología de *Fusarium* sp. (AL-10): a) Aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento difusible de color naranja en cubos de microcultivo. c) Vista de hifas hialinas septadas y macroconidios fusiformes de 3 a 5 células y septados.



a)



b)

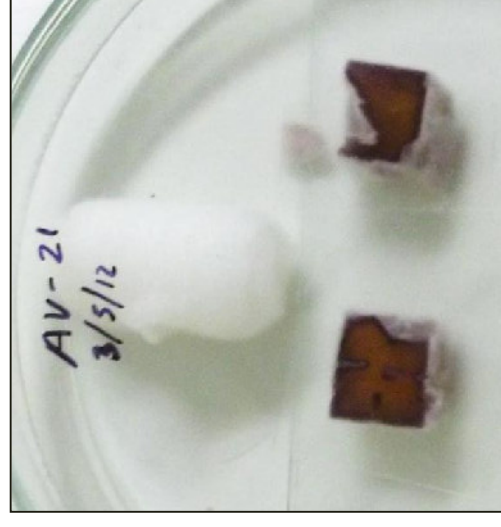


c)

Figura 10 Morfología de *Fusarium* sp. (Lv-1): a) Aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento de color amarillo- naranja en medio sólido. c) Vista en aumento (40X), hifas hialinas septadas y macroconidios fusiformes de 3 a 5 células, septados y en acúmulos.



a)



b)



c)

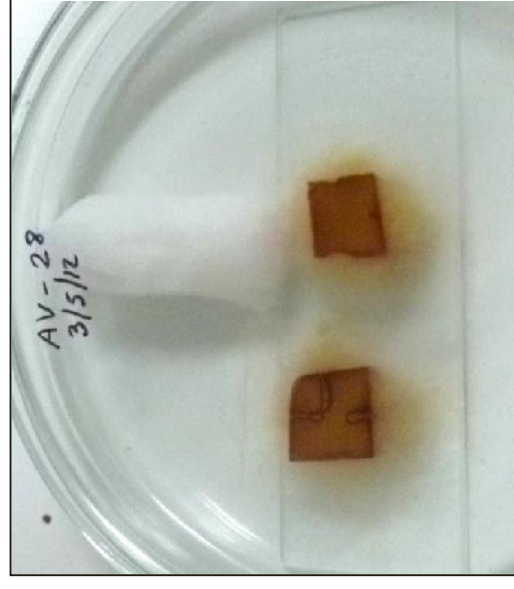


d)

Figura 11 Morfología de *Fusarium* sp. (Av-21): a) aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento púrpura difusible en el medio. c) Vista en aumento (40X), hifas hialinas y microconidios elipsoidales. d) Vista en aumento (100X), de macroconidios fusiformes y septados de 4 a 5 células.



a)



b)



c)



d)

Figura 12 Morfología de *Fusarium* sp. (AV-28): a) aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento color salmón difusible en el medio. c) Vista en aumento (40X), hifas hialinas y microconidios elipsoidales. d) Vista en aumento (100X), de macroconidios fusiformes y septados de 3 a 5 células.



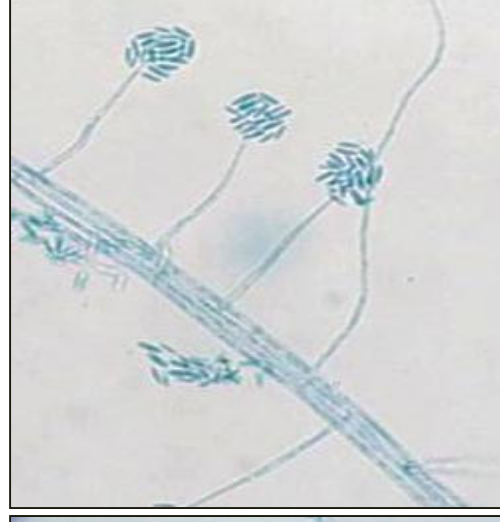
a)



b)



c)

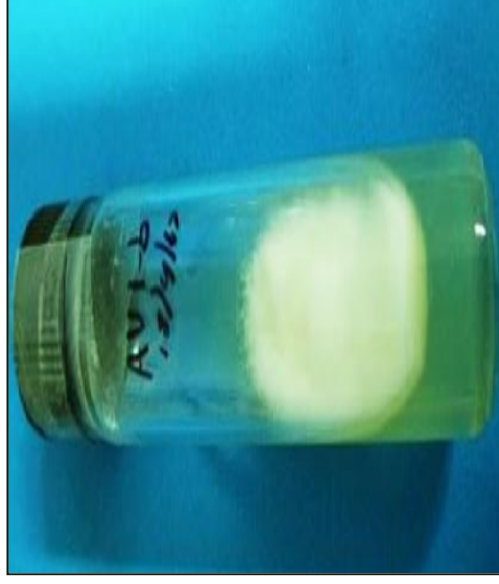


d)

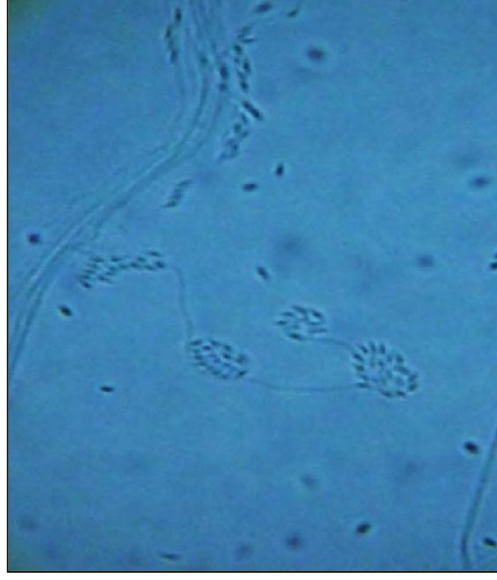
Figura 13 Morfología de *Acremonium* sp. (AL-2a). a) Aspecto de la colonia. b) Sin producción de pigmento. c) Vista de aumento (40X), hifas finas, hialinas y septadas y conidios fusiformes sueltos. d) Vista en aumento (100X), conidios hialinos fusiformes agrupados sobre las filídes a manera de falsas cabezas.



a)



b)



c)

Figura 14 Morfología de *Acremonium* sp. (Av1-b). a) Aspecto de la colonia. b) Sin producción de pigmento. c) Vista de aumento (40X), hifas finas, hialinas y septadas y conidios hialinos fusiformes sueltos y agrupados en filídes a manera de falsas cabezas.



a)



b)



c)

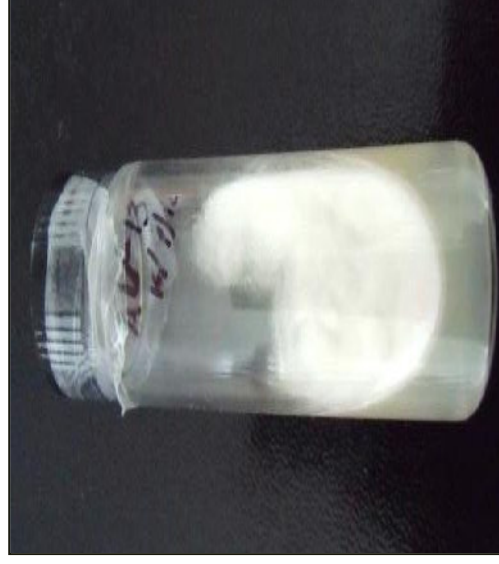


d)

Figura 15 Morfología de *Acremonium* sp. (Av-10). a) Aspecto de la colonia. b) Cambio de coloración de colonias a gris claro. c) Vista de aumento (40X), hifas finas, hialinas y septadas y conidios hialinos fusiformes agrupados en cadena. d) conidios hialinos fusiformes agrupados sobre las filídes a manera de falsas cabezas.



a)

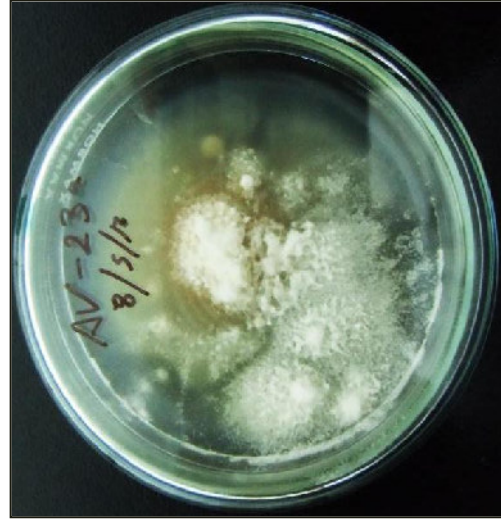


b)

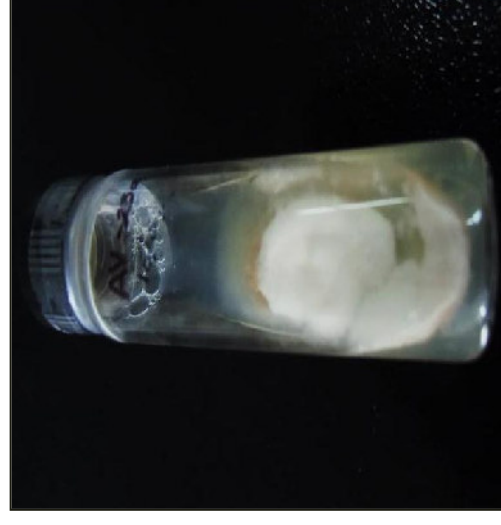


c)

Figura 16 Morfología de *Acremonium* sp. (Av-13): a) Aspecto de la colonia. b) Cambio de coloración de colonias a gris claro. c) Vista de aumento (40X), hifas finas, hialinas y septadas y conidios hialinos fusiformes agrupados sobre las fialides a manera de falsas cabezas y sueltos.



a)



b)

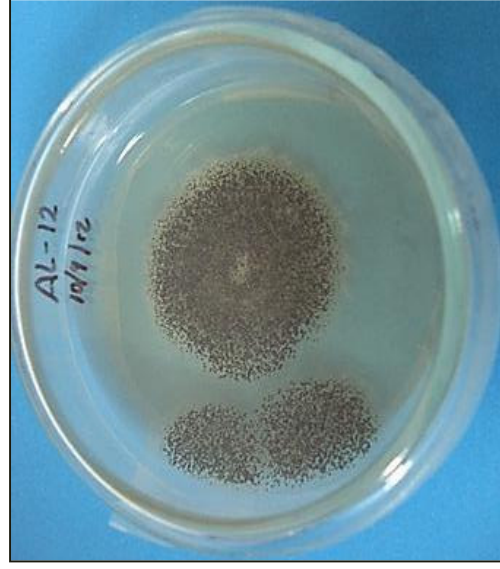


c)



d)

Figura 17 Morfología de *Acremonium* sp. (Av-23a): a) Aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento de color rosa en el medio. c) Vista de aumento (40X), hifas finas, hialinas y septadas y conidios hialinos fusiformes sueltos. d) Vista en aumento (100X), conidios agrupados sobre las fiálides a manera de falsas cabezas.



a)

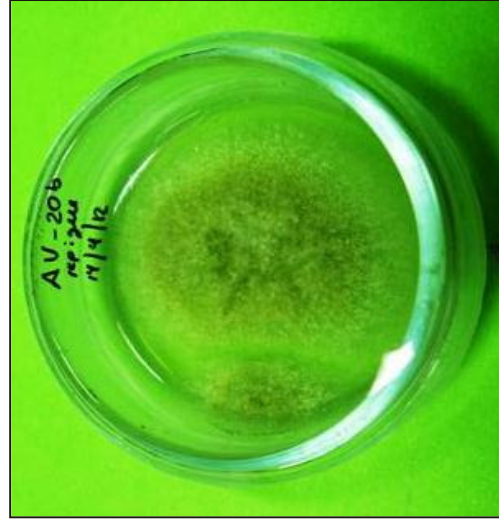


b)

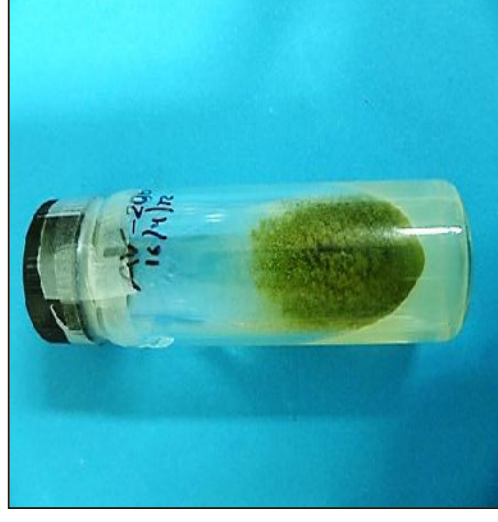


c)

Figura 18 Morfología de *Aspergillus niger* (AL-12): a) Aspecto de la colonia. b) Sin producción de pigmento. c) Vista de aumento (100X), conidióforo hialino y grueso, vesícula subesférica, métulas y conidios de color café, globosos y con crestas irregulares.



a)



b)

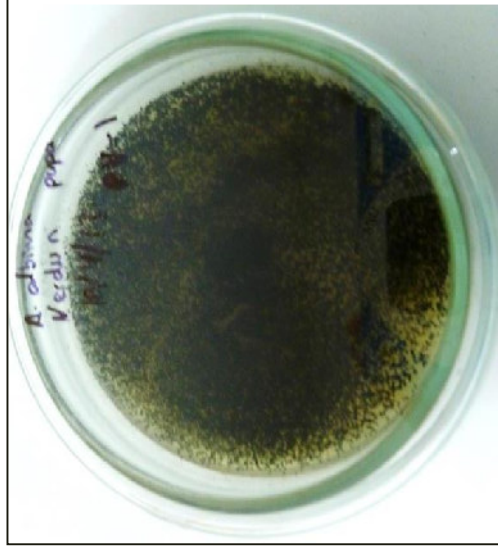


c)

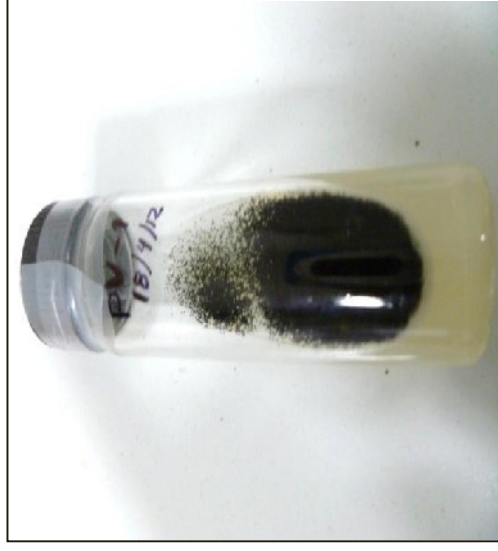


d)

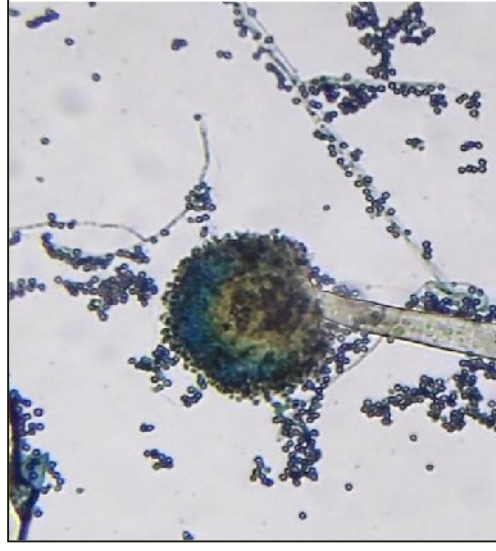
Figura 19 Morfología de *Aspergillus niger* Av-20b. a) Aspecto de la colonia. b) Sin producción de pigmento. c) Vista de aumento (40X), conidióforo hialino y grueso, vesícula subesférica, métulas casi en toda su superficie. d) Vista de aumento (100X) conidios de color verde amarillento estériles y equinulados.



a)



b)

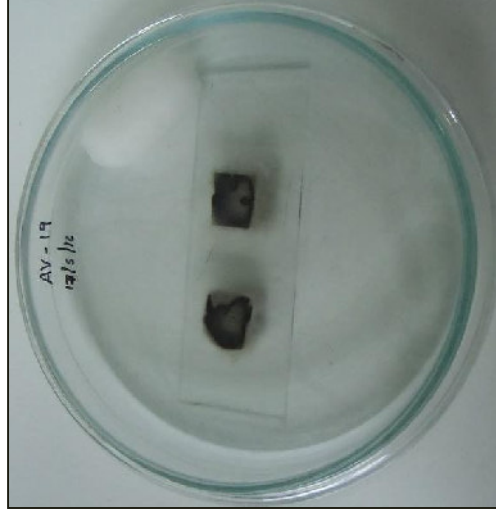


c)

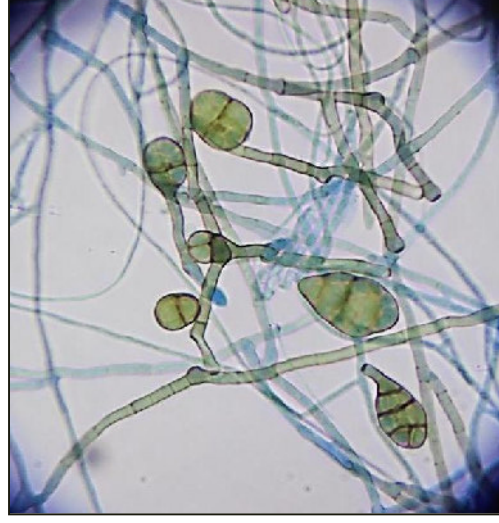
Figura 20 Morfología de *Aspergillus niger* (Pv-1). a) Aspecto de la colonia. b) Sin producción de pigmento. c) Vista de aumento (40X), conidióforo hialino y grueso, vesícula subestérilica, mótulas y conidios de color café, globosos y rugosos.



a)



b)

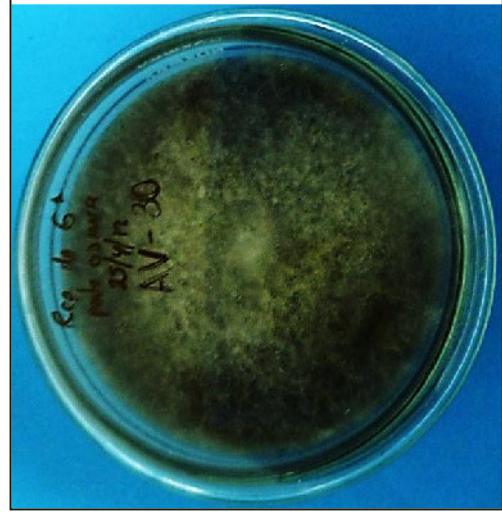


c)

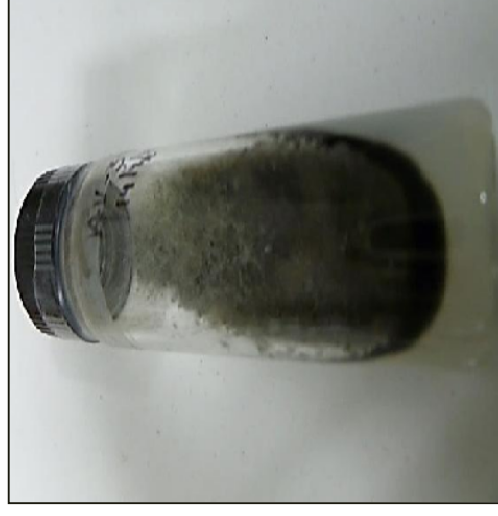


d)

Figura 21 Morfología de *Alternaria* sp. (Av-19). a) Aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento negro. c) Vista de aumento (40X), hifas septadas dematiaceas. d) Vista en aumento (100X), conidio muriforme de color café, con un septo longitudinal y 5 septos transversales y con ornamentación rugosa.



a)



b)



c)



d)

Figura 22 Morfología de *Alternaria alternata* (AV-19): a) Aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento negro. c) Vista de aumento (40X), hifas septadas dematiaceas. d) Vista en aumento (100X), conidios muriformes de color café, con un septo longitudinal y entre 3-4 septos transversales y con ornamentación rugosa.